

Оригінальна стаття

УДК 616.833.58-089.844-092.9

Гайович В.В.

Клініка мікрохірургії та реконструктивної хірургії верхньої кінцівки, Інститут травматології та ортопедії НАМН України, Київ, Україна

Вплив збагаченої тромбоцитами плазми на відновлення нерва і м'яза після їх травматичного ушкодження

Мета. Вивчити вплив збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) на посттравматичні відновні процеси в нерві та м'язах кінцівки.

Матеріали і методи. У щурів лінії WKY виконано невротомію сідничного нерва у середній третині стегна з видаленням його фрагмента довжиною 1 см та його аутопластику з використанням епіневрального шва (кінець в кінець). На операційну рану наносили 1 мл попередньо виготовленої з крові донорів ЗТП. Ефективність відновлення сідничного нерва вивчали за даними гістологічного та морфометричного досліджень, скелетних м'язів — складу амінокислот (АК) тканини.

Результати. Дані гістологічного дослідження сідничного нерва свідчили про активні регенеративні процеси після аутопластики. Кількість регенерованих нервових волокон у дистальному відділі нерва після використання ЗТП достовірно збільшилась на 31,5%. За даними біохімічного аналізу скелетних м'язів, вміст зв'язаних АК після ушкодження на 31,9% менше такого у контролі, після здійснення аутопластики та використання ЗТП — на 25,1% (збільшення вмісту лізину — на 45,2%, аспартату — на 35,1%, валіну — на 11,3%). Вміст вільних АК після введення ЗТП зменшувався.

Висновки. Застосування ЗТП сприяє оптимізації процесів регенерації та васкуляризації сідничного нерва через трансплантат за наявності великих дефектів, підтримує відновні процеси у скелетних м'язах на тлі тривалої посттравматичної денервації, стимулює білковий синтез.

Ключові слова: сідничний нерв, скелетні м'язи, невротомія, відновлення, збагачена тромбоцитами плазма.

Укр. нейрохірург. журн. — 2014. — №3. — С. 79-83.

Надійшла до редакції 02.05.14. Прийнята до публікації 17.06.14.

Адреса для листування: Гайович Василь Васильович, Клініка мікрохірургії та реконструктивної хірургії верхньої кінцівки, Інститут травматології та ортопедії, вул. Воровського, 27, Київ, Україна, 01601, e-mail: gayovich@mail.ru

Вступ. Щороку у світі виконують понад 2 млн. реконструктивних нейрохірургічних операцій з приводу пошкодження периферичних нервів та їх наслідків. Постійний розвиток хірургічних технологій не вирішує проблему високої інвалідності у таких пацієнтів. Пошук і розробка нових ефективних шляхів активації процесів регенерації травмованих нервів і трофічної підтримки денервованих м'язів є актуальним завданням сучасної експериментальної науки і практичної хірургії [1-4]. Зроблений значний крок у встановленні стимулюючого впливу на регенерацію травмованого нерва деяких нейротрофічних чинників, зокрема, NGF, NT-3/4 (специфічні фактори росту нерва). Завдяки доведеній беззаперечності їх впливу зростає інтерес і до проблеми спрямованого підтримання активності відновних процесів у тканинах шляхом застосування ЗТП, синоніми: тромбоцитний концентрат, тромбоцитний гель, platelet-rich plasma (PRP), що містить велику кількість різноспрямованих факторів росту [5, 6]. Вважають, що з тромбоцитів рідкої плазми або гелю вивільняється значна кількість різних факторів росту та цитокінів, що стимулюють репаративні процеси в ушкоджених тканинах [7-9]. Проте, відсутність доказів змін метаболізму в скелетних м'язах після ушкодження периферичного нерва та відповідної

стимуляції ЗТП не дозволяє зробити обґрунтовані висновки щодо доцільності корекції метаболічних змін, спрямованих на їх реіннервацію [10, 11].

Мета дослідження: вивчити вплив ЗТП на перебіг післятравматичних відновних процесів у периферичному нерві та денервованих м'язах кінцівки.

Завдання дослідження: з використанням гістологічних та морфометричних методів проаналізувати процеси регенерації сідничного нерва; встановити вплив ЗТП на денервовані скелетні м'язи в експерименті.

Матеріали і методи дослідження. Експериментальне дослідження проведене на щурах-самцях лінії WKY (n=21) масою тіла 210-220 г. Тварини розподілені на 3 групи: 1-ша — 5 інтактних щурів, 2-га — 8 щурів, у яких здійснено невротомію та у подальшому аутопластику сідничного нерва; 3-тя — 8 тварин, у яких здійснено невротомію, аутопластику сідничного нерва і введення ЗТП.

Всі оперативні втручання виконані під загальною анестезією (тіопентал-натрій 60 мг/кг внутрішньочеревинно). Оперативний доступ здійснений у середньо-верхній третині медіальної поверхні задньої кінцівки щура. Розсікали м'які тканини і виділяли сідничний нерв. На рівні його середньої третини

Стаття містить рисунки, які відображаються в друкованій версії — у відтінках сірого, в електронній — у кольорі.

видаляли фрагмент довжиною 1 см, шивали його в дефект ушкодженого нерва протилежними кінцями сегмента за допомогою епіневрального шва. На операційну рану наносили 1 мл попередньо виготовленого з крові донорів ЗТП (рис. 1). ЗТП готували з використанням бичачого тромбіну в співвідношенні 1:7, при цьому концентрація тромбоцитів у 8 разів перевищувала таку у нативній крові, і позбавлена фракції лейкоцитів. Рану зрошували розчином антибіотика (біцилін-3, «Київмедпрепарат») і зашивали. Тварин утримували у стандартних умовах віварію. Всі маніпуляції проводили з дотриманням існуючих норм біоетики [12].

Вплив ЗТП на перебіг відновних процесів аналізували за даними біохімічного, гістологічного та морфометричного досліджень. Для гістологічного дослідження сідничного нерва через 1 міс після травми видаляли фрагменти нерва і фіксували їх у 10%



Рис. 1. Нанесення ЗТП на операційну рану.

розчині нейтрального формаліну. З фіксованих зразків виготовляли зрізи на кріотомі і імпрегнували срібля нитратом. Препарати фотографували за допомогою цифрової фотокамери та мікроскопа Olympus BX 51 (Японія). Порівняння отриманих морфометричних результатів і статистичну обробку проводили з використанням t-критерію Ст'юдента.

Склад АК м'язів гомілки та стегна оперованої кінцівки визначали за методом S. Moor [13]. Отримані результати порівнювали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. За результатами гістологічного дослідження змін у травмованому сідничному нерві після аутопластики вивчали перебіг активних регенеративних процесів. В ділянках проксимального та дистального епіневрального швів відзначали активне формування нейрогліальних утворень (гліальна організація). Як у регенераційній невромі, так і в дистальному відділі шва виявляли ділянки гліального рубця і рекурентні нервові волокна. Процеси посттравматичного неоангіогенезу, як правило, передують багатьом процесам, у тому числі колагеногенезу [7], що ми спостерігали у досліджуваних ділянках нерва, а саме, між пучками новоутворених нервових волокон виявляли численні активовані нейроремоцити та новоутворені гемокапіляри. Щільність нервових волокон у дистальному відділі травмованого сідничного нерва становила у середньому $(4860,4 \pm 443,6)$ од/мм² ($P=0,011$), тобто 45,2% від такої у контрольній групі (див. таблицю, рис. 2).

Показники структурно-метаболічного відновлення сідничного нерва після аутопластики.

Групи тварин	Щільність нервових волокон			Вміст зв'язаних АК, мкг/г
	М±m, од/мм ²	% (до травми)	% (до норми)	
1-ша	10731,0±416,9	—	—	294,9±11,9
2-га	4860,4±443,6*	—	45,2	200,9±14,1*
3-тя	8591,8±558,3*∇	76,7	80,1	219,6±10,6*

Примітка. Різниця показників достовірна у порівнянні з такими: * — у тварин 1-ї групи; ∇ — у тварин 2-ї групи ($P<0,05$).

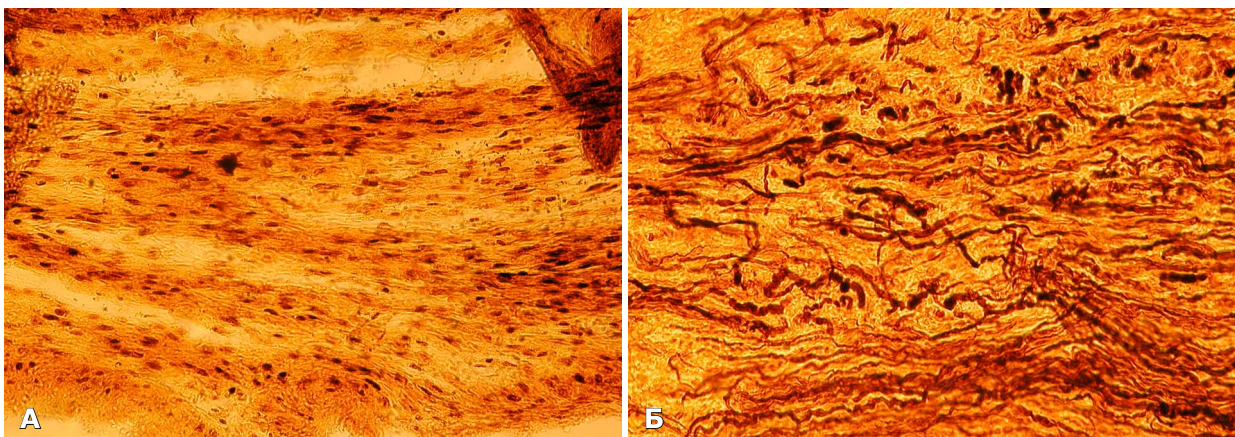


Рис. 2. Мікрофото. Структурні особливості перебігу регенеративних процесів в дистальному відділі сідничного нерва після аутонейропластики. А — низька активність регенерації після аутопластики, поодинокі групи активованих нейроремоцитів; Б — неупорядкована регенерація нервових волокон після аутопластики та введення ЗТП. Імпрегнація срібля нитратом. 36.х200.

Після використання ЗТП в ділянці травмованого нерва спостерігали значне збільшення темпів відновних процесів. У невромі і дистальному відділі нерва значно збільшилася кількість мієлінових нервових волокон і кровоносних судин, проте, в зоні дистального шва відзначали ускладнення регенерації нервових волокон, що пов'язане з утворенням гліальних рубців.

Встановлений значний опосередкований трофічний вплив ЗТП на скелетні м'язи, а саме, активація біохімічних процесів у м'язовому волокні. За даними біохімічного аналізу складу АК денервованих скелетних м'язів ушкодженої кінцівки спостерігали активацію білкового синтезу при використанні ЗТП. Загальний вміст зв'язаних АК після ушкодження у середньому на 31,9% менший, ніж у контролі, а після

аутопластики і введення ЗТП — на 25,1%. При детальному вивченні змін рівня вільних АК в денервованих і частково реіннервованих скелетних м'язах кінцівок встановлене зменшення вмісту АК більш ніж на 33%. Вміст треоніну в гідролізаті м'язових білків після невротомії достовірно менший — на 37,5% ($U_{\text{емп}}=0$, $U_{\text{кр}}=1$, $p<0,01$; $U_{\text{кр}}=6$, $p<0,05$); валіну — на 34,1% ($U_{\text{емп}}=0$, $U_{\text{кр}}=2$, $p<0,01$; $U_{\text{кр}}=4$, $p<0,05$); ізолейцину і лізину — у середньому на 33,3% ($U_{\text{емп}}=0$, $U_{\text{кр}}=2$, $p<0,01$; $U_{\text{кр}}=7$, $p<0,05$); лейцину — на 30,7% ($U_{\text{емп}}=1$, $U_{\text{кр}}=2$, $p<0,01$; $U_{\text{кр}}=6$, $p<0,05$) (рис. 3). Поряд з цим спостерігали зміни пулу вільних АК. На тлі травми та аутопластики встановлене збільшення вмісту таких вільних АК: лізину — на 55,8% ($U_{\text{емп}}=0$, $U_{\text{кр}}=1$, $p<0,01$; $U_{\text{кр}}=6$, $p<0,05$); аргініну — на 44,5% ($U_{\text{емп}}=0$, $U_{\text{кр}}=1$, $p<0,01$;

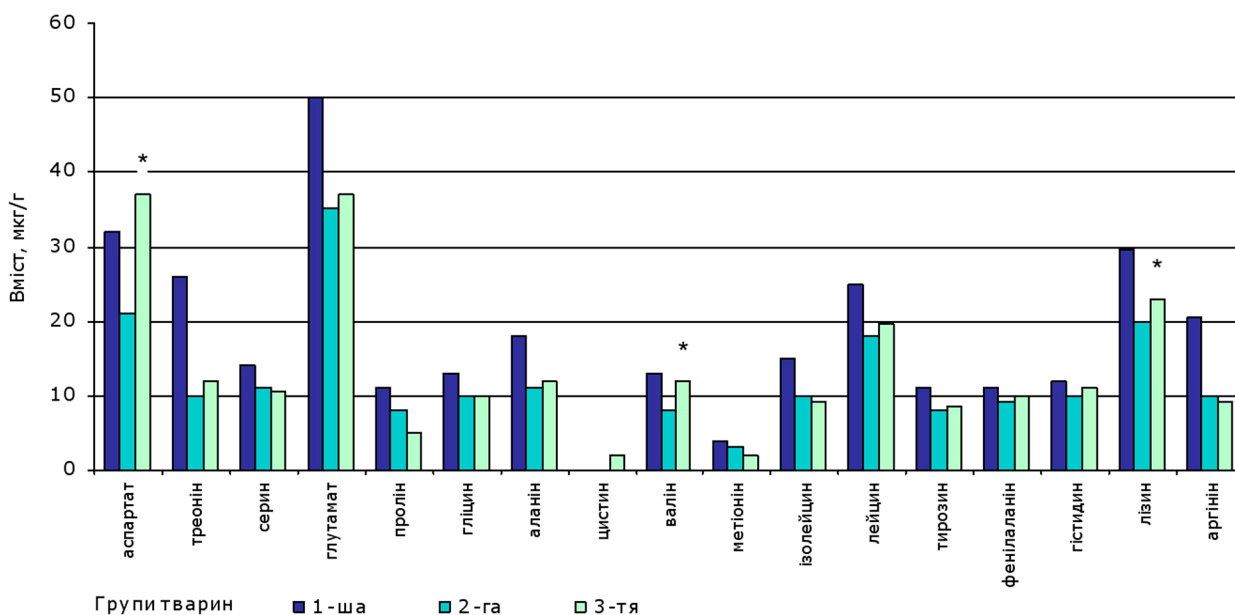


Рис. 3. Рівень зв'язаних АК м'язів при травмі периферичного нерва. * — Різниця показників достовірна у порівнянні з такими у 2-й групі ($P<0,05$).

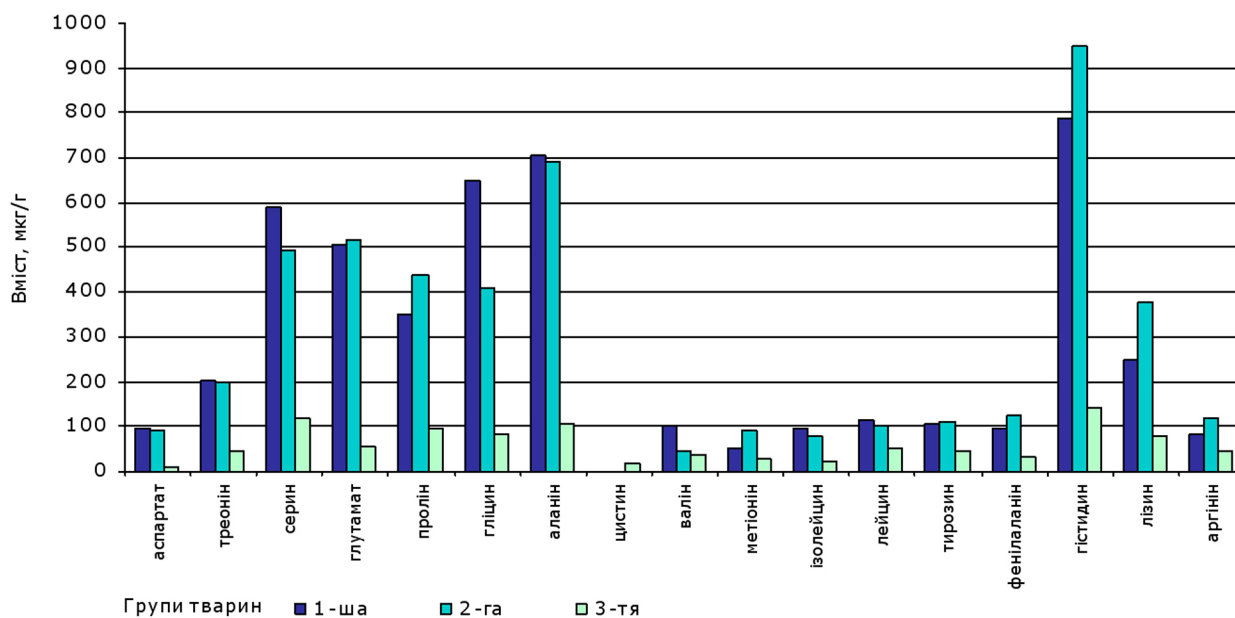


Рис. 4. Рівень вільних АК у м'язах при травмі периферичного нерва.

$U_{кр}=7$, $p<0,05$); гістидину — на 19,8% ($U_{емп}=2$, $U_{кр}=3$, $p<0,01$; $U_{кр}=6$, $p<0,05$) і частково — інших АК, що зумовлене протеолізом у м'язових волокнах (рис. 4).

Принципово інші реакції спостерігали після введення ЗТП в ділянку аутопластики сідничного нерва. Відзначене достовірне збільшення вмісту зв'язаного валіну — на 45,2% ($U_{емп}=0$, $U_{кр}=1$, $p<0,01$; $U_{кр}=7$, $p<0,05$), аспарагінової кислоти — на 35,1% ($U_{емп}=0$, $U_{кр}=1$, $p<0,01$; $U_{кр}=6$, $p<0,05$) і лізину — на 11,3% ($U_{емп}=2$, $U_{кр}=3$, $p<0,01$; $U_{кр}=6$, $p<0,05$), що свідчило не лише про стабілізацію, а й певну активацію білкового синтезу після аутопластики. Вміст вільних АК після введення ЗТП також зменшувався, в той же час виявлення в дослідних зразках м'язів цистину можна пояснити наявністю цієї АК в ЗТП гелі.

Представлені результати біохімічних досліджень щодо вмісту вільних і зв'язаних АК доповнюють і пояснюють процеси, що відбуваються в денервованих м'язах при травм нерва і частково реіннервованих волокон скелетних м'язів після аутопластики дефектів нерва. Вони переконливо свідчать, що в цих м'язах відбуваються процеси регенерації, білкового синтезу і часткової структурно-функціональної перебудови та відновлення, тобто, переважно анаболічні процеси, а не дистрофія м'язових волокон.

Аналіз і зіставлення результатів гістологічних і біохімічних досліджень свідчать про перспективи застосування ЗТП безпосередньо для активації відновних процесів при порушеннях, спричинених травмою периферичних нервів. Аутогенна тромбоцитарна маса стимулює утворення колагену, індукує ангіогенез, стимулює швидке й повноцінне проростання нейронецитів через ділянку аутопластики, справляє опосередкований вплив на життєдіяльність денервованих скелетних м'язів, забезпечує їх повноцінну реіннервацію, досягнення позитивних результатів оперативного втручання, запобігає виникненню післяопераційних ускладнень. Ці особливості ЗТП зумовлені наявністю в гранулах тромбоцитів, насамперед, високоактивних і численних факторів росту та інших біологічно активних речовин (PDGF, IGF, EGF, FGF, TGF- β), що сприяють реалізації відновного процесу [5–9].

Висновки. 1. На підставі аналізу результатів гістологічних та біохімічних досліджень встановлено, що локальне введення ЗТП прискорює відновні процеси у периферичному нерві і скелетних м'язах після травматичного ушкодження. Застосування ЗТП сприяє оптимізації регенерації та васкуляризації трансплантата великих дефектів та дистального відділу ушкодженого сідничного нерва. Аутогенний збагачений тромбоцитами гель, що вводять у тканини стегна і гомілки дослідних щурів, стимулює регенерацію нерва через трансплантований фрагмент, про що свідчить збільшення кількості нервових волокон у дистальному відділі на 76,7% і досягає 80% від такої в контрольній групі. Це зумовлене впливом на процеси колагеногенезу і ангіогенезу в місці епіневральных швів.

2. Поряд з цим, у скелетних м'язах встановлено суттєве зменшення пулу вільних АК і тенденцію до активації білкового синтезу, що є проявом активуючого впливу на відновні процеси у скелетних м'язах.

3. Таким чином, ЗТП опосередковано, через вивільнення факторів росту, впливає на регенерацію травмованого периферичного нерва, оптимізує перебіг відновних процесів у скелетних м'язах, що забезпечує позитивний клінічний результат оперативного лікування.

Список літератури

1. Патоморфологічні зміни скелетних м'язів і залежності деяких клінічних, електрофізіологічних та морфологічних показників у хворих з ушкодженням нервів верхньої кінцівки / В.В. Григоровський, С.С. Страфун, О.Г. Гайко, В.В. Гайович, О.М. Білінова // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2011. — №2. — С.17–25.
2. Креатин как метаболический модулятор структуры и функции скелетных мышц при силовой тренировке у человека: эргогенные и метаболические эффекты / А.И. Нетреба, Б.С. Шенкман, Д.В. Попов, А.Б. Вдовина, А.С. Боровик, Я.Р. Бравый, А.П. Шарова, В.П. Хотченков, Т.Н. Стеханова, О.Л. Виноградова // Рос. физиол. журн. — 2006. — №1. — С.113–122.
3. Samchukov M. Birch mechanism of skeletal muscle adaptation to gradually increasing length / M. Samchukov, A. Makarov, J. Cherkashin // 2nd International Meeting of ASAMI. — Roma: Scientific Abstracts, 2001. — P.73.
4. Skeletal muscle fiber type conversion during the repair of mouse soleus: Potential implications for muscle healing after injury / T. Matsuura, Y. Li, J. Giacobino, F.H. Fu, J. Huard // J. Orthop. Res. — 2007. — V.25, N11. — P.1534–1540.
5. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature / J. Alsousou, M. Thompson, P. Hulley, A. Noble, K. Willett // J. Bone Joint Surg. Br. — 2009. — V.91, N8. — P.987–996.
6. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet rich plasma separation systems / T.N. Castillo, M.A. Pouliot, H.J. Kim, L.J. Dragoo // Am. J. Sports Med. — 2010. — V.39, N2. — P.266–271.
7. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model / H.H. Cho, S. Jang, S.C. Lee, H.S. Leong, J.S. Park, J.Y. Han, K.H. Lee, Y.B. Cho // Laryngoscope. — 2010. — V.120, N5. — P.907–913.
8. Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model / E. Emel, S.S. Ergün, D. Kotan, E.B. Gürsoy, Y. Parman, A. Zengin, A. Nurten // J. Neurosurg. — 2011. — V.114, N2. — P.522–528.
9. Yu W. Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury / W. Yu, J. Wang, J. Yin // Int. J. Neurosci. — 2011. — V.121, N4. — P.176–180.
10. Берснев В.П. Хирургия нервов нижних конечностей / В.П. Берснев, Г.С. Кокин // Травматология и ортопедия. — 2006. — Т.3. — С.862–884.
11. Опорная и опорно-динамическая функция нижних конечностей у больных с переломами костей голени / В.А. Щуров, С.И. Швед, И.В. Щуров, Н.В. Сазонова // Гений ортопедии. — 2008. — №2. — С.9–12.
12. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. — Washington: National Academy Press, 1996. — 136 p.
13. Moor S. The chromatography of aminoacids on sulfonated polystyrene resins / S. Moor, W.H. Stein // J. Biol. Chem. — 1951. — V.192. — P.2830–2839.

Гайович В.В.

Клиника микрохирургии и реконструктивной хирургии верхней конечности, Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины, Киев, Украина

Влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на восстановление нерва и мышцы после их травматического повреждения

Цель. Исследовать влияние обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) на посттравматические восстановительные процессы в нерве и мышцах конечности.

Материалы и методы. У крыс линии WKY выполнена невротомия седалищного нерва в средней трети бедра с удалением его фрагмента длиной 1 см и аутопластика с наложением эпинеурального шва (конец в конец). На операционную рану наносили 1 мл предварительно изготовленной из крови доноров OTP. Эффективность восстановления седалищного нерва изучали по данным гистологического и морфометрического исследований, скелетных мышц — состава аминокислот в ткани.

Результаты. Данные гистологического исследования седалищного нерва свидетельствовали об активных регенеративных процессах после аутопластики. Количество регенерированных нервных волокон в дистальном отделе нерва после использования OTP достоверно увеличилось на 31,5%. По данным биохимического анализа скелетных мышц, содержание связанных аминокислот после повреждения на 31,9% меньше такового в контроле, после осуществления аутопластики и введения OTP — на 25,1% (увеличение содержания лизина — на 45,2%, аспартата — на 35,1%, валина — на 11,3%). Содержание свободных аминокислот после введения OTP уменьшалось.

Выводы. Применение OTP способствует оптимизации процессов регенерации и васкуляризации седалищного нерва через трансплантат при наличии значительных дефектов, поддерживает восстановительные процессы в скелетных мышцах на фоне длительной посттравматической денервации, стимулирует белковый синтез.

Ключевые слова: седалищный нерв, скелетные мышцы, невротомия, восстановление, обогащенная тромбоцитами плазма.

Укр. нейрохірург. журн. — 2014. — №3. — С. 79-83.

Поступила в редакцию 02.05.14. Принята к публикации 17.06.14.

Адрес для переписки: Гайович Василий Васильевич, Клиника микрохирургии и реконструктивной хирургии верхней конечности, Институт травматологии и ортопедии, ул. Воровского, 27, Киев, Украина, 01601, e-mail: gayovich@mail.ru

Gayovich V.V.

Clinic of Microsurgery and Reconstructive Surgery of Upper Extremity, Institute of Traumatology and Orthopedics, NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

Effect of platelet-rich plasma on nerve and muscle regeneration after their traumatic injury

The purpose. To investigate the effect of platelet-rich plasma (PRP) on posttraumatic recovery processes in nerve and muscles of the extremity.

Materials and methods. Neurotomy of sciatic nerve was performed in WKY rats in the middle third of the thigh with its fragment removing (1 cm) and further autoplastics ("end-to-end" neurorrhaphy). 1 ml of PRP made from donors blood was applied on the surgical wound. The effectiveness of sciatic nerve recovery was studied according to histological and morphometric data, skeletal muscles — according to composition amino acids in tissues.

Results. Data of sciatic nerve histological examination showed active regenerative processes after autoplastics. The number of renewed nerve fibers in the distal nerve after PRP using significantly increased by 31.5%. According to data of biochemical analysis of skeletal muscle linked amino acids level after injury was 31.9% less than in control, after autoplastics and PRP application — 25.1% less (lysine level increased by 45.2%, aspartate — by 35.1%, valine — by 11.3%). The level of free amino acids after PRP introduction decreased.

Conclusions. PRP application optimizes regeneration and vascularization of sciatic nerve through the grafts at large defects, maintains renewing in skeletal muscles at prolonged posttraumatic denervation, stimulates protein synthesis.

Key words: sciatic nerve, skeletal muscle, neurotomy, renewing, platelet-rich plasma.

Ukr Neyrokhir Zh. 2014; 3: 79-83.

Received, May 5, 2014. Accepted, June 17, 2014.

Address for correspondence: Vasyl Gayovich, Clinic of Microsurgery and Reconstructive Surgery of Upper Extremity, Institute of Traumatology and Orthopedics, 27 Vorovskogo St., Kiev, Ukraine, 01601, e-mail: gayovich@mail.ru