



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57217 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТРАВМОВАНОГО ПЕРИФЕРІЙНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ БІОФЛАВОНОЇДІВ НА РАННІХ ЕТАПАХ (В ЕКСПЕРИМЕНТІ)

1

2

(21) u201012359

(22) 20.10.2010

(24) 10.02.2011

(46) 10.02.2011, Бюл.№ 3, 2011 р.

(72) ХРАПАЙ ОЛЕНА ВОЛОДИМИРІВНА, ЧАЙ-
КОВСЬКИЙ ЮРІЙ БОГДАНОВИЧ(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ(57) Спосіб оцінки ефективності регенерації трав-
мованого периферійного нерва під впливом біоф-
лавоноїдів на ранніх етапах (в експерименті), що
включає дослідження нервових тканин, який **відпри-**
зняється тим, що після відтворення стандартної

моделі травми периферійного нерва вводять па-
раневрально протягом десяти днів ліпофлаво-
ною дозою 0,1 мг/кг, ліпін дозою 0,1 мг/кг, корвітин до-
зою 0,2 мг/кг, через 3 та 6 тижнів роблять забір
матеріалу для ультраструктурного дослідження,
визначають щільність нервових волокон і кут їх
відхилення від осі травмованого нерва, отримані
результати порівнюють з контролем і при змен-
шенні дегенерації нервових волокон і кровоносних
судин, а також зниженні розвитку фіброзу у трав-
мованому нерві оцінюють ефективність регенера-
ції травмованого периферійного нерва під впли-
вом біофлавоноїдів на ранніх етапах.

Корисна модель, що заявляється, відноситься
до медицини, а саме до фармакотерапії хвороб
нервової системи і може бути використана для
покращення результатів лікування травматичних
ушкоджень периферійного нерва.

Пошук нових ефективних методів лікування
травм периферійних нервів, незважаючи на бага-
торічні дослідження, залишається актуальним [1,
2, 3, 4].

Незважаючи на розроблені хірургічні і терапе-
втичні методи лікування даної патології, функціо-
нальні результати регенерації периферійних нер-
вів далеко не завжди задовільні [5, 6].

Раніше нами були вивчені особливості фарма-
кологічної корекції структурних порушень, що роз-
виваються у травмованому сідничному нерві в
експерименті [7]. Було показано, що лікарські за-
соби Ліпофлавоно і Корвітин з ліпіном мали позити-
вний ефект на окремих етапах відновлення (12
тижнів). Терапія цими препаратами покращувала
ефективність регенерації нервових волокон і кро-
воносних судин у всіх відділах пошкодженого нер-
ва (проксимальному, дистальному, зоні травми).
Для більш детального вивчення дії цих препаратів
проведені досліді на ранніх термінах посттравма-
тичного періоду (3 і 6 тижнів).

Ліпін представляє собою фосфатидилхолін, а
Корвітин - кверцетин, запобігає руйнування клітин-
них мембран. Препарат Ліпофлавоно, будучи ліпо-
сомальною формою кверцетину, є більш ефектив-
ною формою доставки лікарського засобу до
терапевтичних мішеней.

Задача, яку вирішує спосіб, що заявляється,
полягає у порівняльному вивченні впливу біофла-
воноїдів (корвітин, ліпофлавоно, ліпін) на ранніх
етапах відновлення (3 і 6 тижнів).

Технічний результат буде полягати у затримці
процесу регенерації, що проявляється зниженням
дегенерації нервових волокон, кровоносних судин,
розвитку фіброзу периферійного відрізка травмо-
ваного нервового стовбура.

Поставлена задача досягається тим, що у ві-
домому способі, що включає дослідження нерво-
вих тканин, згідно корисної моделі, після відтво-
рення стандартної моделі травми периферійного
нерва вводять параневрально протягом десяти
днів ліпофлавоно в дозі 0,1 мг/кг, ліпін в дозі 0,1
мг/кг, корвітин в дозі 0,2 мг/кг, через 3 та 6 тижнів
роблять забір матеріалу для ультраструктурного
дослідження, визначають щільність нервових во-
локон і кут їх відхилення від осі травмованого нер-
ва, отримані результати порівнюють з контролем і
при зменшенні дегенерації нервових волокон і

(19) UA (11) 57217 (13) U

кровоносних судин, а також зниженню розвитку фіброзу у травмованому нерві оцінюють ефективність регенерації травмованого периферійного нерва під впливом біофлавоноїдів на ранніх етапах.

Спосіб здійснюється наступним чином:
Досліди проведені на 47 білих щурах (самках) масою тіла 180-250 г. Тварини були розподілені на 5 груп. Опис груп наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл тварин по групах залежно від періоду змісту

Група	Препарат	Період відновлення
1	Контроль (n=7)	-
2	Корвітин + Ліпін (n=10)	3 тижні
3	Корвітин + Ліпін (n=10)	6 тижнів
4	Ліпофлавіон (n=10)	3 тижні
5	Ліпофлавіон (n=10)	6 тижнів

Повну аксотомію сідничного нерва експериментальних тварин відтворювали у наступному порядку: виробляли оперативний доступ до правого сідничного нерва, останній мобілізували і перерізували на рівні середини стегнової кістки щурів. Проксимальний і дистальний кінці нерва зшивали епіневральним швом ниткою "Ethicon" (Шотландія) 10/0 на атравматичній голці, залишаючи діастаз розміром 1 мм. Проксимальний відділ нерва на відстані 3-5 мм від області травмування роздроблювали за допомогою пінцета. Рану зашивали наглухо. Препарати вводили параневрально протягом десяти днів після травми. Ліпофлавіон ("Біолік", Харків) вводили в дозі 0,1 мг/кг, Ліпін ("Біолік", Харків) - 0,1 мг/кг, Корвітин ("Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", Київ) - 0,2 мг/кг. Через 3 та 6 тижнів у тварин робили забір матеріалу для подальшого ультраструктурного дослідження. Для гістологічного дослідження нерви фіксували протягом доби в 10% нейтральному формаліні. Виготовляли зрізи на кріотомі і імпрегнували в азотнокисле срібло [8]. Для вивчення фармакологічного ефекту досліджуваних препаратів використовували морфометричні показники: щільність нервових волокон і кут їх відхилення від осі травмованого нерва. Експериментальні дослідження на тваринах проводили з урахуванням вимог Guide of the care and use of laboratory animals (1996).

Вплив комбінованої дії ліпіну з корвітином на посттравматичне відновлення нерва.

Через 3 тижні після операції спостерігали поліморфний характер процесів регенерації структурних елементів пошкодженого нерва. У всіх відділах встановлено наявність нервових волокон, але їх кількість і особливості розташування в окремих зонах істотно відрізнялися. У проксимальному відділі характер розподілу нервових волокон істотно не відрізнявся від контрольних. Але нервові волокна були гіперімпрегновані, зазначено проліферацію шванівських клітин і формування нових аксонів. Щільність нервових волокон при травмуванні нерва зменшується, при цьому збільшується їх кут відхилення від осі пошкодженого нерва (Табл.2, 3). Нервові волокна поблизу епіневрії часто мали ампульноподібні розширення аксонів, зустрічалися спіралі Перрончіто. У зоні шва волокна були розташовані поблизу поверхні регенераційної неврони, формуючи окремі кластери, огинаючи зону

шва. У більшості тварин в зоні шва формується сполучнотканинний рубець, в якому також були присутні спіралі Перрончіто. У дистальному відділі нервові волокна мають звивистий вигляд і орієнтовані дифузно. Навколо волокон відзначено активну проліферацію шванівських клітин і фібробластів. Зустрічали рекурентні нервові волокна. Таким чином, на ранніх етапах (3 тижні) після травми Ліпін з Корвітином сприяють регенерації нервових волокон в дистальний відділ. Формування сполучнотканинних рубців ускладнює ці процеси, про що свідчить утворення спіралей Перрончіто та рекурентних волокон. Також відзначені ознаки розвитку запального процесу.

Через 6 тижнів після травми спостерігали поліморфний характер процесів регенерації структурних елементів пошкодженого нерва. У проксимальному відділі зустрічаються додаткові групи нервових волокон, які мають тонкий і часто звивистий вигляд. Щільність їх розташування відновлюється до контрольних значень, але кут відхилення нервових волокон від осі нерва збільшений (Табл.2, 3). У більшості нервових волокон присутня шванівська оболонка, але її товщина не рівномірна. Також зазначено проліферацію фібробластів і утворення кровоносних судин. У зоні шва нервові волокна мають різноспрямовану орієнтацію, що обумовлено наявністю груп сполучнотканинних рубців. Нервові волокна в таких зонах зупиняються в регенерації, про що свідчить їх гіперімпрегнація і формування спіралей Перрончіто з ампульноподібними розширеннями аксонів. Поблизу епіневрії зазначено безліч кровоносних судин різного діаметра. Дистальний відділ на 6-му тижні після травмування представлений декількома тяжами нервових волокон, які гіпоімпрегновані і орієнтовані дифузно. Щільність волокон на 6-му тижні відновлення істотно зросла в порівнянні з попереднім періодом. При цьому кут відхилення нервових волокон від осі нерва не змінився (Табл.2, 3). Між ними як і раніше триває проліферація шванівських клітин. Зустрічаються поодинокі дегранульовані тканинні базофіли.

Таким чином, на 6 тижні відновного періоду тривають регенераційні процеси в травмованому нерві. У проксимальному відділі завершується мієлінізація новостворених нервових волокон, а в дистальному - волокна формують окремі великі

тяжі. При цьому формування сполучнотканинних рубців і запальні реакції тривають.

Вплив Ліпофлакону на посттравматичний відновлення нерва.

Під впливом Ліпофлакону особливості морфологічних змін на 3 тижні після травми мали трохи інший характер. Макроскопічно всі відділи травмованого нерва, як і попередніх груп, чітко розрізнялися. У проксимальному відділі нервові волокна істотно не відрізнялися від контрольних, і характеризувалися різною товщиною мієлінових оболонок. Нервові волокна були гіперімпрегновані, навколо них зустрічаються активні шванівські клітини і колби зростання. Щільність їх розташування не відрізняється від контрольних значень. Але кут відхилення нервових волокон значно збільшився (Табл.2, 3). Зустрічалися групи кровоносних судин. Вони часто формують сплетення та анастомози, безліч посудин проростає в зоні травми. Ампулоподібні розширення аксонів зустрічаються лише у деяких нервових волокон, розташованих поблизу епіневрія. У зоні шва нервові волокна були розташовані як на поверхні регенераційної неврони, так і в її товщі, просіка її наскрізь. Такий характер регенерації в області шва обумовлений зниженням розвитку сполучнотканинних рубців. У результаті цього кількість регенованих волокон в дистальному відділі збільшилася. Щільність волокон достовірно збільшилася в порівнянні з групою тварин, які отримували Ліпін з Корвітин. При цьому характеристика відхилення нервових волокон мала інший характер. Кут волокон значно знизився, що може свідчити про безперешкодний проростання

нервових волокон в дистальний нерв. Таким чином, на ранніх етапах (3 тижні) після травми, Ліпофлакон в більшій мірі сприяв регенерації нервових волокон у травмованому нерві. В основі цього зниження розвитку фіброзу та активний ангиогенез.

Через 6 тижнів після травми більшість нервових волокон у проксимальному відділі були мієлінізовані. Відзначено незначне зменшення щільності нервових волокон. Але кут відхилення нервових волокон відповідає контрольним значенням (Табл.2, 3). Проліферація фібробластів і шванівських клітин відзначена лише в окремих зонах переходу проксимального відділу в зону шва. У зоні шва нервові волокна формують групи великих кластерів. Поблизу епіневрія зазначено безліч кровоносних судин різного діаметра. Дистальний відділ на 6 тижні після травмування представлений декількома тяжами, в яких нервові волокна гіпо- та гіперімпрегновані і орієнтовані вздовж осі нерва. Між ними присутні активні шванівські клітини. Щільність волокон на 6 тижні відновлення достовірно збільшився у порівнянні з корвітин і Ліпіні, а кут відхилення нервових волокон мав подібну тенденцію.

Таким чином, на 6-му тижні відновного періоду під дією Ліпофлакону продовжують розвиватися процеси, описані на ранніх етапах відновлення. Нервові волокна активніше регенерують у дистальний відділ нерва вздовж судин, які відновлюються після травми. У дистальному відділі нервові волокна формують окремі великі тяжі. При цьому істотного формування сполучнотканинних рубців і розвитку запальних реакцій не відзначено.

Таблиця 2

Зміна щільності розташування нервових волокон в нормі і при фармакокорекції на ранніх етапах відновлення.

Група	Проксимальний відділ	Зона травми	Дистальний відділ
Контроль	10505,05±346,77		
Корвітин + Ліпін (3 тиж.)	9250,68±385,365 a	8516,64±333,01	6024,43±200,67 a
Корвітин + Ліпін (6 тиж.)	10132,59±385,38	9669,64±671,68	8188,80±184,71 a
Ліпофлакон (3 тиж.)	10450,17±258,63 b	8693,92±590,38	6948,04±460,74 a,b
Ліпофлакон (6 тиж.)	9471,04±211,51 a	9175,56±485,13	9071,29±287,04 a,b

a - достовірно по відношенню до контролю ($p < 0,05$);

b - достовірно по відношенню до травми з введенням ліпіну з Корвітином ($p < 0,05$).

Таблиця 3

Зміна кута відхилення нервових волокон від осі травмованого нерва

Група	Проксимальний відділ	Зона травми	Дистальний відділ
Контроль	23,77±1,64 ⁰		
Корвітин + Ліпін (3 тиж.)	28,55±1,40 ⁰ a	30,98±1,33 ⁰	27,81±1,75 ⁰ a
Корвітин + Ліпін (6 тиж.)	29,71±1,40 ⁰ a	30,45±1,78 ⁰	30,75±1,46 ⁰ a
Ліпофлакон (3 тиж.)	30,83±1,82 ⁰ a	22,15±1,78 ⁰ b	15,35±0,850 a,b
Ліпофлакон (6 тиж.)	25,25±1,80 ⁰	23,82±1,86 ⁰ b	27,14±1,63 ⁰ b

a - достовірно по відношенню до контролю ($p < 0,05$);

b - достовірно по відношенню до травми з введенням ліпіну з Корвітином ($p < 0,05$).

У нашій роботі на обох етапах відновлення (3 і 6 тижнів) відзначався більш вираженою дією Ліпофлавіон, ніж ліпін з Корвітином. При цьому поліпшується регенерація нервових волокон і кровоносних судин. Також відзначено зниження розвитку фіброзу.

Це обумовлено тим, що Ліпофлавіон, який представлений ліпосомальною формою кверцетину (препарат Корвітин), захищає нервові клітини від окислювального стресу, активує ендогенні антиоксидантні системи захисту, знижує розвиток запального процесу і підвищує зростання нейритів [7]. Розроблена в Україні ліпосомальна форма кверцетину, використовується при багатьох захворюваннях і експериментальних патологічних станах, виявилася дуже ефективною. Ліпофлавіон може бути розглянуто як альтернативний препарат у лікарській терапії гострого періоду травми периферичних нервів.

Ліпофлавіон впливає на морфологію регенераційної неврони у вигляді зниження фіброзного компонента в її складі, посиленою васкуляризації, а, отже, сприяє проростанню аксонів в дистальний ділянку.

Ліпофлавіон більшою мірою, ніж Ліпін з Корвітин сприяв регенерації нервових волокон у травмованому нерві.

Джерела інформації:

1. Геращенко С.Б. Периферійний нерв (нейрон-судинно-десмальні взаємовідношення в нормі та патології) / С.Б. Геращенко, О.І. Дельцова, А.К. Коломійцев, Ю.Б. Чайковський. - Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. - 342 с.

2. Цымбалюк В.И. Повышение эффективности микрохирургических операций у больных с последствием травм срединного и локтевого нервов области предплечья / В.И. Цымбалюк, Ю.Б. Чай-

ковский, Л.А. Ломако, Л.И. Фисенко. - К.: АТЗТ "Компания "РАДА", 1998. - 118 с.

3. Сокуренько Л.М. Регенерація периферійного нерва в умовах нейропластики, проведеної в різні терміни після пошкодження, та стимуляції мієліногенезу: автореф. дис. на здобуття наук, ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.09 "Гістологія, цитологія, ембріологія" / Л.М. Сокуренько - К., 2003. - 20 с.

4. Корсак А.В., Чайковський Ю.Б., Грабовий О.М., Скибінська Т.Р. Морфологічна характеристика регенераційної неврони периферійного нерва за умов його пошкодження та застосування омега-3-поліненасичених кислот / А.В. Корсак, Ю.Б. Чайковський, О.М. Грабовий [та ін.] // Морфологія. - 2007. - Т.1, №3. - С. 50-53.

5. Siemionow M. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair / M. Siemionow, G. Brzezicki // Int. Rev. Neurobiol. - 2009. - Vol. 87 - P. 141-172.

6. Dornseyfer U. Surgical therapy of peripheral nerve lesions: current status and new perspectives / U. Dornseyfer, K. Matiassek, M. A. Fichter [et al.] // Zentralbl. Neurochir. - 2007. - Vol. 68. - P. 101-110.

7. Храпай Е.В. Липофлавіон підвищує регенерацію нервних волокон в умовах експериментальної моделі травми периферического нерва / Е.В. Храпай // Інноваційні технології у експериментальній медицині та біології: Актуальні проблеми сучасної медицини. - Полтава, 2010. - С. 116.

8. Коломійцев А.К. Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для парафиновых и целлоидиновых срезов / А.К. Коломійцев, Ю.Б. Чайковский, Т.Л. Терещенко // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1981. - Т. 81, №8. - С. 93-96.