



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58524 (13) U
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ВПЛИВУ НЕЙРОПЕПТИДНИХ ЗАСОБІВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПЕРИФЕРІЙНОГО НЕРВА ЩУРІВ

1

(21) u201013638

(22) 17.11.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ДЕМИДЧУК АНАСТАСІЯ СЕРГІЇВНА, ЧАЙКОВСЬКИЙ ЮРІЙ БОГДАНОВИЧ, МАКАРЕНКО ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб оцінки впливу нейропептидних засобів на регенерацію периферійного нерва щурів, що включає дослідження нервових тканин, який **відкривається** тим, що після відтворення моделі травми периферійного нерва в центральному відрізку нервового стовбура з третьої доби щоденно внут-

2

рішньочеревно вводять церебралізін в дозі 0,1 г/кг протягом 21 дня, церебрал в дозі 0,1 г/кг протягом 3 днів, потім відбирають регенераційні неврони з прилеглими відрізками ушкодженого сідничного нерва і визначають щільність розподілу нервових волокон та середній кут відхилення нервових волокон від поздовжньої осі нерва, отримані результати порівнюють з контролем і при збільшенні середнього значення щільності розподілу нервових волокон в периферійному відрізку травмованого нерва та зменшенні середнього кута відхилення аксонів від поздовжньої осі нерва в ділянці регенераційної неврони визначають вплив нейропептидних (церебралізін та церебрал) засобів на регенерацію периферійного нерва.

Корисна модель, що заявляється, відноситься до медицини, а саме, гістології та фармакології і може бути використана для визначення впливу нейропептидних засобів на регенерацію периферійного нерва щурів.

Вивчення регенерації нервових волокон є важливим завданням, оскільки відновлення функцій ушкоджених периферійних нервів залишається недостатньо вивченим у всьому світі [6]. Порушення функцій кінцівок внаслідок травмування периферійних нервів призводять до втрати працездатності та до тяжкої інвалідизації хворих. Водночас ця проблема є недостатньо вивченою, оскільки більше 60 % потерпілих стають інвалідами II-III груп [1, 2, 3]. Серед пацієнтів переважають хворі до 45 років (85,9 %), а середній вік становить 31,2 року [5].

Частота таких травм перевищує 6 % в структурі загального травматизму, що є клінічною та соціальною проблемою.

Однією з вад лікування травм сідничного нерва, що утрудняє його регенерацію, є пізнє надходження хворих на обстеження і лікування. Тільки 26 % хворих потрапляють на лікування до 3 місяців, а 76 % - більше ніж через 3 місяці після отримання травми [4].

Виходячи з цього, актуальною проблемою сучасної клінічної і теоретичної медицини є пошук

оптимальних способів стимуляції регенерації і відповідно зменшення часу лікування хворого.

Задача, яку вирішує спосіб, що заявляється полягає у вивченні особливості процесів де- та регенерації нервового стовбура за умов застосування нейропептидних засобів.

Технічний результат при вирішенні задачі полягає в зменшенні часу лікування хворого шляхом стимуляції регенерації периферічного нерва.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який включає дослідження нервових тканин, згідно корисної моделі, після відтворення моделі травми периферійного нерва в центральному відрізку нервового стовбура з третьої доби щоденно внутрішньочеревно вводять церебралізін в дозі 0,1 г/кг протягом 21 дня, а церебрал в дозі 0,1 г/кг протягом 3 днів, потім для дослідження відбирають регенераційні неврони з прилеглими відрізками ушкодженого сідничного нерва і визначають щільність розподілу нервових волокон та середній кут відхилення нервових волокон від поздовжньої осі нерва, отримані результати порівнюють з контролем і при збільшенні середнього значення щільності розподілу нервових волокон в периферійному відрізку травмованого нерва та зменшенні середнього кута відхилення аксонів від поздовжньої осі нерва в ділянці регенераційної неврони визначають вплив нейропеп-

(13) U

(11) 58524

(19) UA

тидних (церебралізін та церебрал) засобів на регенерацію периферійного нерва.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Експериментальні спостереження були проведені на 90 білих щурах вагою 150-200 г. Експериментальні тварини були розподілені на 3 групи:

Перша група - 30 щурів, тваринам виконувався оперативний доступ до лівого сідничного нерва, після чого нерв у ділянці середньої третини перетинався, здійснювався гемостаз і рана зшивалась наглухо. Потім, через 10 днів у цих же тварин проводилося повторне оперативне втручання, яке полягало в тому, що знаходилися кінці пересіченого нерва, освіжались і зшивалися епіневральним швом.

Друга група - 30 щурів, яким була відтворена вищевказана модель травми периферійного нерва за умов застосування церебраліну, який вводили з третьої доби щоденно протягом 21 дня.

Третя група - 30 щурів, яким була відтворена вищевказана модель травми периферійного нерва за умов застосування церебралу, який вводили з третьої доби щоденно на протязі трьох днів.

В післяопераційному періоді тваринам першої групи внутрішньочеревинно вводили 0,9 % фізіологічний розчин, тваринам другої групи внутрішньочеревинно вводили церебралізін в дозі 0,1 г/кг, а тваринам третьої групи вводили церебрал в дозі 0,1 г/кг.

Матеріалом для дослідження були регенераційні неврони з прилеглими відрізками ушкодженого сідничного нерва через 3,6,12 тижнів після відтворення моделі травми периферійного нерва.

Для світлооптичної мікроскопії матеріал фіксували у 10 %-му розчині формаліну, промивали та отримували зрізи на заморожувальному мікротомі, які потім імпрегнували азотнокислим сріблом за швидким методом імпрегнації азотнокислим сріблом елементів периферійної нервової системи (Коломійцев А.К. та співав., 1981). Для вивчення сполучної тканини препарати забарвлювали азур II-еозином. Для аналізу результатів світлооптичної мікроскопії за допомогою морфометрії використовували комп'ютерну програму UTHSCSA Image Tool for Windows (version 2.00) та стандартну окулярну вставку. Були визначені такі показники: щільність розподілу нервових волокон та середній кут відхилення нервових волокон від поздовжньої осі нерва в ділянці регенераційної неврони. При статистичному аналізі морфометричних даних обчислювали середні значення величин, середню похибку. Порівняння отриманих результатів проводили за допомогою непараметричного критерію Манна-Вітні-Вілкоксона.

Через 3 тижні після операції у тварин, яким була відтворена модель травми периферійного нерва в центральному відрізку нервового стовбура спостерігаються гіпо- та гіперімпрегнація. Разом з тим яскраво виражена хвилястість контуру, та набухання нервових волокон. Відмічається помірна розмежованість на фрагменти.

В цей термін у ділянці травми вже є сформована неврома, в якій можна побачити поодинокі новоутворені нервові волокна. Значна частина осьових циліндрів пролягає косо, поперечно або

рекурентно. Середній кут відхилення аксонів від поздовжньої осі нерва становить $43,2 \pm 2,5^\circ$ (табл.). Разом з тим спостерігається неоднорідне розташування кровоносних судин.

У периферійному (дистальному) відрізку сідничного нерва в цей час відмічається дуже мала кількість регенеруючих нервових волокон, які мають дрібний діаметр і розташовуються некомпактно. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $320 \pm 14,03/\text{мм}^2$.

Через 3 тижні після операції у тварин, яким була відтворена модель травми периферійного нерва та застосовувався церебралізін, в центральній (проксимальній) частині травмованого нерва та в ділянці неврони відмічаються ті самі явища, що були описані в попередній групі тварин.

У тварин цієї групи в невромі з'являється невелика кількість нервових волокон, які не мають поздовжнього напрямлення. Середній кут відхилення аксонів від поздовжньої осі нерва становить $37 \pm 0,9^\circ$, що статистично достовірно менше ніж в групі I (табл.).

В цей термін у периферійному відділі спостерігаються тонкі нервові волокна, які врастаючи з регенераційної неврони, розподіляються відносно рівномірно. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $320 \pm 14,03/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в групі I (табл.).

У тварин, яким була відтворена запропонована експериментальна модель травми сідничного нерва та застосовувався церебрал, через 3 тижні після операції в центральному відділі травмованого нерва відмічається гіпо- та гіперімпрегнація. Спостерігається незначна рівномірна направленість нервових волокон, що суттєво відрізняється від попередніх груп.

В невромі в цей період відмічається наявність невеликої кількості кровоносних судин та новоутворених нервових волокон. Більша частина з осьових циліндрів останніх пролягає від центрального відрізка до периферійного в поздовжньому напрямку, невелика частина має невпорядковане розташування. Середній кут відхилення аксонів від поздовжньої осі нерва становить $31,3 \pm 1,3^\circ$, що статистично достовірно менше ніж в групі II та у контролі (табл.).

В дистальному відрізку периферійного нерва тварин цієї групи виявлені бунгнерівські стрічки та в незначній кількості тонкі нервові волокна, які врастаючи з регенераційної неврони, розподіляються відносно рівномірно. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $1468 \pm 44,1/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в групі II та у контролі (табл.).

Через 6 тижнів після операції у тварин, яким була відтворена запропонована експериментальна модель травми периферійного нерва в центральному відрізку нервового стовбура стають менш виразними зміни імпрегнаційних властивостей та хвилястість контуру волокон. Відмічається помірна розмежованість на фрагменти.

В цей термін у ділянці травми вже є сформована неврома, в якій можна побачити більшу кількість новоутворених нервових волокон у порівнянні з попереднім строком. Осьові циліндри,

складаючись у пучки, прямують з центрального до периферійного відрізка, але, зустрічаючись з остривами фіброзу оминають їх по периферії або змінюють свій прямолінійний хід. Середній кут відхилення аксонів від повздовжньої осі нерва становить $42,3 \pm 1,2^\circ$ (табл.).

У периферійному (дистальному) відрізку сідничного нерва в цей час виявляються в значній кількості регенеруючі нервові волокна, багато з яких мають більший діаметр в порівнянні з попереднім терміном. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $1468 \pm 44,1/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в попередньому строчці (табл.).

Через 6 тижнів після операції у тварин, яким була відтворена запропонована експериментальна модель травми та застосовувався церебралізін ознаки регенерації стають кращими, тобто новосформовані осьові циліндри мають більший діаметр, кут відхилення стає менший. В невромі відмічається зменшення клітинних елементів (фібробластів) Середній кут відхилення аксонів від повздовжньої осі нерва становить $42,3 \pm 1,2^\circ$, що достовірно менше відносно попереднього строку і контролю (табл.).

Периферійна ділянка травмованого нерва містить більше молодих нервових волокон, які мають тенденцію, до більш рівномірного розташування. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $3655 \pm 29,54/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в попередньому строчці та контролі (табл.).

У тварин, яким була відтворена запропонована експериментальна модель травми периферійного нерва та застосовувався церебрал, через 6 тижнів після операції в центральному відділі трав-

мованого нерва відмічається відсутність розмежованості на фрагменти, контури волокон стають більш чіткими.

В ділянці невроми, сполучна тканина розташовується острівками, кількість колагенових волокон стає меншим, у порівнянні з попередніми групами і розміщуються останні рівномірно. Середній кут відхилення аксонів від повздовжньої осі нерва становить $35 \pm 0,6^\circ$, що достовірно менше відносно групи II і контролю (табл.).

В периферійному відрізку у цей час виявляються нервові волокна в більш значній кількості, вони мають сформовану мієлінову оболонку. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $3888 \pm 36,8/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в попередньому строчці, контролі та групі II (табл.).

Через 12 тижнів після операції у тварин, яким була відтворена запропонована експериментальна модель травми периферійного нерва в центральному відділі ще зберігаються ознаки подразнення, що відзначається гіпо- та гіперімпрегнацією.

В ділянці травми в цей період спостерігається регенераційна неврома, нервові волокна ще розташовуються косо, поперечно та рекурентна. Середній кут відхилення аксонів від повздовжньої осі нерва становить $40,01 \pm 1,2^\circ$, що достовірно менше відносно попереднього строку (табл.). У периферійному відділі значно зросла кількість нервових волокон порівняно з попереднім терміном, але поступаються кількістю нервовим волокнам центрального відрізка. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $7691 \pm 28/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в попередньому строчці (табл.).

Таблиця

Кількісні параметри регенерації сідничного нерва щура в різні терміни після травми

Групи	Середній кут відхилення нервових волокон від повздовжньої осі нерва в невромі сідничного нерва (в градусах) $M \pm m$			Щільність розподілу нервових волокон в периферійному відділі сідничного нерва ($1/\text{мм}^2$) $M \pm m$		
	3 тижні	6 тижнів	12 тижнів	3 тижні	6 тижнів	12 тижнів
Група I	$43,2 \pm 2,5$	$42,3 \pm 1,2$	$40,01 \pm 1,2^a$	$320 \pm 14,03$	$3143 \pm 26,96^a$	7691 ± 28^a
Група II	$37 \pm 0,9^b$	$27,9 \pm 1,1^{ba}$	$34,54 \pm 0,6^{ba}$	$976 \pm 16,1^b$	$3655 \pm 29,54^{ab}$	$7961 \pm 43,4^{ab}$
Група III	$31,3 \pm 1,3^{bc}$	$35 \pm 0,6^{abc}$	$26,5 \pm 0,9^{bc}$	$1468 \pm 44,1^{bc}$	$3888 \pm 36,8^{abc}$	$9182 \pm 58,8^{abc}$

Різниця достовірна ($p < 0,05$):

a - по відношенню до попереднього строку

b - по відношенню до контролю

c - по відношенню до групи II

В ділянці травми в цей період спостерігається регенераційна неврома, нервові волокна ще розташовуються косо, поперечно та рекурентна. Середній кут відхилення аксонів від повздовжньої осі нерва становить $40,01 \pm 1,2^\circ$, що достовірно менше відносно попереднього строку (табл.). У периферійному відділі значно зросла кількість нервових волокон порівняно з попереднім терміном, але поступаються кількістю нервовим волокнам центрального відрізка. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $7691 \pm 28/\text{мм}^2$, що

статистично достовірно більше ніж в попередньому строчці (табл.).

В цей термін у тварин, яким застосовували церебралізін в центральному відділі практично не спостерігається явище подразнення.

В ділянці невроми практично всі волокна розташовуються поздовжньо, але є і рекурентні нервові волокна. Середній кут відхилення аксонів від повздовжньої осі нерва становить $34,54 \pm 0,6^\circ$, що достовірно менше відносно попереднього строку та контролю (табл.).

В периферійному (дистальному) відрізку сідничного нерва в цей час відмічається збільшення кількості регенеруючих нервових волокон, які візуально практично не поступаються нервовим волокнам центрального відрізка. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $7961 \pm 43,4/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше ніж в попередньому строчці та контролі (табл.).

У тварин, яким була відтворена запропонована експериментальна модель травми периферійного нерва та застосовувався церебрал через 12 тижнів після травми в центральному відділі сідничного нерва практично відсутні ознаки подразнення, що проявляється лише наявністю незначних ділянок гіпо- або гіперімпрегнації.

Ділянка неврови практично втрачає свої межі, що проявляється зменшенням кількості клітин сполучної тканини. Пучки колагенових волокон розташовані відносно рівномірно та є відносно тонкими, між ними пролягають кровоносні судини. Середній кут відхилення аксонів від повздожньої осі нерва становить $26,5 \pm 0,9^\circ$, що достовірно менше відносно групи II та контролю (табл.). В регенераційній невромі лише іноді виявляються незначні зони фіброза зі зниженим вазальним забезпеченням та щільним скупченням пучків колагенових волокон.

Периферійний (дистальний) відділ травмованого нерва має практично однаковий вигляд з центральним відрізком, тому що новоутворені нервові волокна мають високу щільність і практично повздожнє направлення. Середнє значення щільності розподілу аксонів становить $9182 \pm 58,8/\text{мм}^2$, що статистично достовірно більше

ніж в попередньому строчці, контролі та групі II (табл.).

Таким чином, при застосуванні церебралу після травми сідничного нерва спостерігається збільшення середнього значення щільності розподілу нервових волокон в периферійному відрізку травмованого нерва та зменшення середнього кута відхилення аксонів від повздожньої осі нерва в ділянці регенераційної неврови в усіх термінах експерименту, що вказує на покращення процесів регенерації.

Література:

1. Некоторые выводы по поводу успехов ауто-трансплантации нервов человека / Григорович К.А // Вопросы нейрохирургии - 1989 - № 6 - С. 19-23.
2. Нейроваскулярная ауторегуляция регенерации нервов верхней конечности / Куропаткин А.И // Вопросы нейрохирургии - 1989. - № 1. - С. 35-39.
3. Дегенерация и регенерация нерва при военной травме / Лаврентьев Б.И. // Бюллетень экспериментальной биологии. - 1944. - Т. 18. - № 6. - С. 346-351.
4. Фомін Т.М. Травматичні ушкодження сідничного нерва / клініка, діагностика та хірургічне лікування: Автореф. дис. канд. мед. наук. - 14.01.057 Фомін Т. М. - Київ, 1999. - 15 с.
5. Мікрохірургія периферичних нервів з функціональним принципом виконання відновлювальної операції / Хонда О.М. // Бюлетень УАН. - 1998. - № 6. - С. 28-29.
6. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs / Evans G.R. // Anatomy Research. - 2001. - V. 263, is. 4. - P. 396-404.