



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87206** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 31/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2013 10373	(72) Винахідник(и):	Храпай Олена Володимирівна (UA), Чайковський Юрій Богданович (UA)
(22) Дата подання заявки:	23.08.2013	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	27.01.2014		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.01.2014, Бюл.№ 2		

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

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності регенерації травмованого периферійного нерва під впливом ліпофлавону на пізніх етапах (в експерименті) включає дослідження нервових тканин. Після відтворення стандартної моделі травми периферійного нерва вводять параневрально протягом десяти днів ліпофлавін, ліпін, корвітин, через 12 тижнів роблять забір матеріалу для подальшого ультраструктурного дослідження, визначають щільність нервових волокон і кут їх відхилення від осі травмованого нерва, отримані результати порівнюють з контролем і при зменшенні дегенерації нервових волокон і кровоносних судин, а також зниженні розвитку фіброзу у травмованому нерві оцінюють ефективність регенерації периферійного нерва під впливом ліпофлавону на пізніх етапах.

UA 87206 U

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

Проблема регенерації нервових стовбурів привертає до себе увагу багатьох дослідників у галузі біології і медицини, так як ушкодження периферичних нервів призводить до інвалідизації, особливо в молодому віці. Одночасно з цим даний аспект є недостатньо вивченим, оскільки як і раніше більш 60 % постраждалих стають інвалідами II-III груп (1,3,4,5)

Пошук нових ефективних методів лікування травми периферійних нервів, незважаючи на багаторічні дослідження, залишається актуальним (1,3,4,5).

Незважаючи на розроблені хірургічні і терапевтичні методи лікування даної патології, функціональні результати регенерації периферійних нервів далеко не завжди задовільні (6,7).

В основу корисної моделі поставлена задача вивчення характеру процесів де- і регенерації в травматично пошкодженному нерві у щурів, а також їх фармакологічна корекція ліпофлавану на пізніх етапах відновного процесу.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що включає дослідження нервових тканин, згідно з корисною моделлю, після відтворення стандартної моделі травми периферійного нерва вводять параневрально протягом десяти днів ліпофлаван дозою 0,1 мг/кг, ліпін дозою 0,1 мг/кг, корвітин дозою 0,2 мг/кг, через 12 тижнів роблять забір матеріалу для подальшого ультраструктурного дослідження, визначають щільність нервових волокон і кут їх відхилення від осі травмованого нерва, отримані результати порівнюють з контролем і при зменшенні дегенерації нервових волокон і кровоносних судин, а також зниженні розвитку фіброзу у травмованому нерві оцінюють ефективність регенерації периферійного нерва під впливом ліпофлавану на пізніх етапах.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Досліди проведені на 14 білих щурах (самках) масою тіла 200-250 г. Тварини були розділені на 3 групи: I - контроль, інтактні тварини (n=7); II - травма нерва (n=9); III - травма з використанням ліпофлавану (n=10). 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 розмозжали за допомогою пінцета. Рану зашивали наглухо. Препарати вводили параневрально протягом десяти днів після травми. Ліпофлаван ("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 12 тижнів у тварин виробили забір матеріалу для подальшого ультраструктурного дослідження. Окремі зразки нерва (проксимальний і дистальний кінці, зона шва) фіксувалися в 2,5 % розчині глутаральдегід з подальшою дофіксацією в 1 % розчині осмієвої кислоти на фосфатному буфері при pH 7,4. Матеріал зневоднюють в спиртах висхідної концентрації і заливають в суміш епоксидних смол Епон-аралдіт. З епоксидних блоків виготовляють ультратонкі зрізи на ультратомі Райхарт (Голландія). Для підвищення контрастності ультратонкі зрізи фарбують розчином уранілацетату і цитратом свинцю, переглядали в електронному мікроскопі EM-400т фірми Philips (Голландія) [6]. Морфометричні дослідження проводились на мікроскопі Olympus BX 51 (Японія) за допомогою програми (UTHSCSA ImageTool, Version 2.0 (alpha 3) для Microsoft Windows 95, Windows NT).

Вимірювали площу мієлінових нервових волокон та їх осьових циліндрів, товщину і площу мієлінової оболонки, середня кількість ламелей мієлінової оболонки у нервовому волокні [2]. Достовірність міжгрупових відмінностей чисельних значень оцінювали згідно з t-критерієм Ст'юдента.

На момент взяття зразків тканини експериментальних тварин в області невротомії спостерігалися зрощення решт дистального і проксимального відділів нерва, в зоні шва виявляли розвиток посттравматичного рубця і відновлення васкуляризації нерва. Через 12 тижнів у тканині нерва спостерігали виражені структурні зміни в нервових волокнах і стінці капілярів у всіх досліджуваних відділах перерізаного нерва.

У проксимальному відділі нерва встановлено наявність набряку навколо капілярів, що виявляється в відшаруванні базальної мембрани від структурно змінених ендотеліоцитів. Ендотелій на люменальній поверхні формує випинання, цитоплазма різко вакуолізована мікропіноцитозними везикулами. В окремих місцях базальна мембрана має виражену деструкцію. Навколо капілярів проксимального відділу визначаються численні пучки колагенових волокон, які орієнтовані в різних напрямках. У цих зонах встановлена інфільтрація

лейкоцитами. Мієлінові оболонки пошкоджених нервових волокон деформовані, вони втратили свою округлу або овальну форму, набуваючи не властиву їм структуру. Зустрічаються полігональні і плоскі мієлінізовані нервові волокна. В окремих волокнах аксоплазми електронно-щільні, без наявності очікуваних органел. Також у проксимальному відділі відзначається наявність безмієлінових нервових волокон у стані гідропічної дистрофії. Шванівські клітини таких волокон електронно-щільні. Відзначено значне зменшення морфометричних показників нервових волокон (Таблиця 1). У зоні безпосередньої невротомії нами були встановлені суттєві відмінності в організації структури нерва, описані для попереднього відділу травмованого нерва. У зоні шва сформований сполучнотканинний рубець, який практично повністю позбавлений судинних елементів нерва. Судини в зоні формування рубця регенерували по периферії і відрізняються за своїм ультраструктурними особливостям від судин нерва інтактних тварин. Капіляри, локалізовані ближче до рубця, характеризуються вираженими порушеннями: їх стінка тонка, а ядра окремих ендотеліоцитів набувають полігональної, зірчастої форми. Люменальна і базальна поверхні цих клітин формують випинання. Цитоплазма багатьох ендотеліоцитів наповнена множинними мікропіноцитозними везикулами, особливо на базальному полюсі клітин. Мітохондрії цих клітин пошкоджені, вони не мають властиву даними органідам організацію кріст: крісти відсутні або роздуті. У зоні рубця зустрічаються також капіляри в стазованому стані, в просвіті яких скупчення еритроцитів і тромбоцитів. Перицити даної досліджуваної області травмованого нерва розташовані на певній відстані від базальної мембрани капілярів, навколо них відзначається набряк тканини. Досить високий рівень васкуляризації встановлений на периферії регенераційної невроми. Саме вздовж цієї новоствореної судинної системи відзначаються процеси регенерації нервових стовбурів. Мієлінова оболонка регенерованих нервових волокон в зоні шва має локальні розшарування ламелі, але частіше вона гомогенно профарбована осмієм, електронно-щільна. Аксоплазма цих волокон має елементи аксоскелета, везикули і мітохондрії. Цитоплазма активованих нейролемоцитів характеризується ознаками активації: визначаються стопки апарату Гольджі та ендоплазматичного ретикулуму, відновлюється мікрорегіональна базальна мембрана навколо окремих нервових волокон. Також в зоні шва зустрічаються регенеровані нервові волокна овальної і плоскої форми. В окремих волокнах мієлінова оболонка деформована у вигляді нашарування, при цьому повного ультраструктурного відновлення ламелярної організації мієліну, характерного для інтактних нервових волокон, не встановлено. У зоні шва відзначається скупчення активованих фібробластів і макрофагів. Навколо них розташовані численні пучки різноспрямованих колагенових волокон, стан неколагеногенезу. При вивченні дистального відділу сідничного нерва щурів при повній невротомії була встановлена різко виражена картина структурно-функціональних змін. Судини середнього калібру своєю внутрішньою поверхнею формують листоподібні випинання, які різко звужують просвіт судини. Капіляри в цьому відділі нерва характеризуються високою транспортної активністю, що виявляється у формуванні численних мікропіноцитозних везикул в цитоплазмі ендотеліоцитів. Базальна мембрана таких капілярів дисоційована, з локальною деструкцією. На периферії капілярів відзначаються осередки рубцювання: скупчення численних пучків колагенових волокон і активованих фібробластів з макрофагами. Поблизу цих зон волокна знаходяться в стані дегенерації, їх мієлінові оболонки деформовані, електронно-щільні. У міжклітинному просторі зустрічаються окремі ламелеподібні просвіти. Безмієлінові волокна також з ознаками порушень структурної організації, їх аксолема відшарована від відростків нейролемоцитів. Одночасно з цим багато шванівських клітин в активному стані: цитоплазма з елементами апарату Гольджі та ендоплазматичного ретикулуму, мітохондріями. Ядра клітин з диспергованим хроматином. Мієлінізовані нервові волокна відокремлені від навколишньої міжклітинки мікрорегіональною базальною мембраною, яка в багатьох зонах має ознаки деструкції. Між регенерованими нервовими волокнами встановлено наявність груп активованих фібробластів і макрофагів, пучки колагенових волокон. Слід зазначити, що кількість вказаних клітин значно більше, ніж у проксимальному відділі травмованого нерва. Зустрічаються окремі макрофаги і нейролемоцити з фагоцитованими фрагментами детриту пошкоджених нервових волокон.

При вивченні дії ліпофлакону встановлено, що в проксимальному відділі травмованого нерва нервові волокна розташовувалися групами і між ними зустрічалися колби зростання. Навколо регенерованих волокон були присутні пучки колагенових волокон, як і у тварин без лікування препаратом. У зростаючих аксонах зустрічаються елементи цитоскелету, мітохондрії. В окремих місцях зростаючі аксони розташовані групами.

Встановлено, що Ліпофлакон стимулює ангиогенез в області травми нерва. У цьому відділі травмованого нерва множинні кровоносні судини формують анастомози. Відзначається

відновлення ультраструктурної організації гемокапілярів: у проксимальному відділі і зоні шва, а їх базальна мембрана менш пошкоджена. В області шва при введенні Ліпофлакону також зустрічаються колби зростання і нервові волокна на різних стадіях мієлінізованого процесу. У аксонах добре розвинені елементи аксоскелета, присутні мітохондрії і везикули. У дистальному відділі капіляри характеризуються локальним відшаруванням базальної мембрани і їх локальною деструкцією. При використанні ліпофлакону зростає кількість регеноерованих нервових волокон у проксимальному і дистальному відділі. У всіх досліджуваних відділах травмованого нерва зустрічаються новоутворені нервові волокна. Встановлено відновлення їх ультраструктурної організації. Мієлінові оболонки мають нормальну структуру без набряку та розшарування (фіг. 1,2). Лише в деяких нервових волокнах зустрічається локальне розшарування ламелей мієліну. Шванівські клітини характеризуються високою синтетичною активністю, про що свідчить зростання в ядрах кількостей еухроматину і формування відростків, що контактують з регеноерованими нервовими волокнами. При впливі Ліпофлакону встановлено збільшення кількості ламелей мієлінових оболонок в проксимальному відділі і області шва (Таблиця 2). Таким чином, Ліпофлакон робить істотний вплив на процеси регенерації та відновлення нервових волокон кровоносних судин і нервових волокон у травмованому нерві. Відновлення структурної організації нерва в більшому ступені відбувається в проксимальному відділі і зоні шва.

Таблиця 1

Показники морфометричних змін нервових волокон дистального відділу нерва при травмуванні і застосуванні лікарських засобів

Група	Площа мієлінового волокна (мкм ²)	Площа осьового циліндра (мкм ²)	Товщина мієлінової оболонки (мкм)	Площа мієлінової оболонки (мкм ²)
Контроль	84,77±18,98	73,27±12,63	1,13±0,21	7,26±0,27
Травма (проксимальний відділ)	54,27±12,18a	44,83±13,62a	0,85±0,19a	5,54±0,24a
Травма (область травми)	39,74±7,33a	33,86±10,09a	0,90±0,15a	5,72±0,24a
Травма (дистальний відділ)	26,62±9,34a	22,04±10,97a	0,52±0,11a	3,40±0,16a
Ліпофлакон (проксимальний відділ)	43,20±14,00a	37,54±11,81a	0,80±0,11a	5,22±0,12a, c
Ліпофлакон (область травми)	33,08±6,07a	26,47±6,51a	0,75±0,16a	4,91±0,18a, b
Ліпофлакон (дистальний відділ)	36,06±9,20a	30,41±11,20a	0,81±0,11a, b	5,42±0,12a, b

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

b - достовірно по відношенню до травми без лікування (p < 0,05);

c - достовірно по відношенню до травми з лікуванням ліпіну та корвітину (p < 0,05).

Таблиця 2

Зміни середньої кількості ламелей мієлінових оболонок в нервових волокнах при травматичному пошкодженні нерва

Група		Проксимальний відділ	Зона травми	Дистальний відділ
1	Контроль	65,33±12,53		
2	Травма	36,00±5,04a	31,60±5,03a	29,20±4,63a
3	Корвітин+Ліпін	44,20±1,85a	38,20±7,42a	30,20±7,42a
4	Ліпофлакон	42,80±5,53a	31,16±3,36a	34,20±6,72a

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

Таким чином, ультраструктурні порушення у травмованому периферичному нерві мають поліморфний характер. При цьому навіть через 12 тижнів посттравматичного періоду ми не спостерігали нормальної структури регеноерованих нервових стовбурів. На підставі аналізу фармакологічної дії ліпофлакону був зроблений висновок про те, що терапія даним препаратом підвищує ефективність регенерації нервових волокон у травмованому нерві. Препарат сприяє регенерації нервових волокон і відновленню їх ультраструктурної організації. При цьому зростає кількість ламелей в мієлінових оболонках нервових волокон, знижується кількість нервових

волокон з набряком і розшаруванням мієліну. Також відзначено активний ангиогенез. Це обумовлено тим, що Ліпофлавіон, який представлений ліпосомальною формою кверцетину, захищає нервові клітини від окислювального стресу, активує ендogenous антиоксидантні системи захисту, знижує розвиток запального процесу і підвищує ріст нейритів [6,7]. Розроблена в

5 Україну ліпосомальна форма кверцетину, використовувана при багатьох захворюваннях і експериментальних патологічних станах, виявилася дуже ефективною. Антиоксидант кверцетин є нерозчинним, тому розроблена його ліпосомальна форма. Ми використовували Ліпофлавіон як більш ефективну форму доставки лікарського засобу до терапевтичних мішеней при

10 травматичному пошкодженні нервових волокон. У нашій роботі представлені результати терапевтичного ефекту ліпофлавіону на пізніх етапах відновного процесу.

Позитивний ефект Ліпофлавіону можна пов'язувати з тим, що ліпосомальна форма, як продукт нанотехнологічних розробок, має високу тропність до клітинних мембран.

Така форма препарату прискорює проростання і мієлінізація нервових волокон. Це пов'язано з антиоксидантними властивостями, які має кверцетин. Навіть при коротких строках

15 вступу (10 днів) Ліпофлавіон демонструє виражений ефект.

Ліпосомальна форма кверцетину (Ліпофлавіон) сприяє ефективній доставці лікарського засобу до терапевтичних мішеней. Це стимулює процеси регенерації нервових волокон і їх відновлення, що може запобігти розвитку дегенеративних процесів на пізніх етапах відновлення.

Джерела інформації:

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

2. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфологічно-функціональні методи досліджень у нормі та при патології. - Житомир: "Полісся", 2005. - 288с.

25

3. Корсак А.В. Регенерація периферійного нерва за умов застосування омега-3-поліненасичених жирних кислот // Авт. дис. к.м.н., Київ, 2008. - 184 с.

4. Сокурєнко Л.М. Регенерація периферійного нерва в умовах нейропластики, проведеної в різні терміни після пошкодження, та стимуляції мієліногенезу // Авт. дис. к.м.н., Київ, 2003. - 180 с.

30

5. Цымбалюк В.И., Чайковский Ю.Б., Ломако Л.А., Фисенко Л.И. Повышение эффективности микрохирургических операций у больных с последствием травм срединного и локтевого нервов области предплечья. - К.: АТЗТ "Компания "РАДА", 1998. - 118 с.

6. Moskaug J.O., Carlsen H., Myhrstad M., Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods // Mechanisms of Ageing and Development. - 2004. - Vol. 125. - P. 315-324.

35

7. Myhrstad M., Carlsen H., Nordstrom O., Blomhoff R., Moskaug J.O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter // Free Radical Biology & Medicine. - 2002. - Vol. 32, № 5. - P. 386-393.

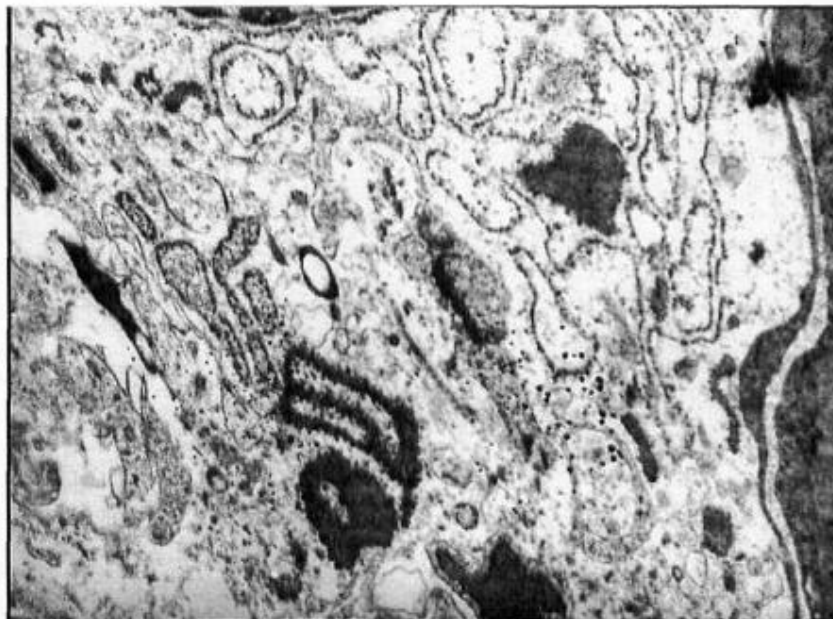
40

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ефективності регенерації травмованого периферійного нерва під впливом ліпофлавіону на пізніх етапах (в експерименті), що включає дослідження нервових тканин, який

45 **відрізняється** тим, що після відтворення стандартної моделі травми периферійного нерва вводять параневрально протягом десяти днів ліпофлавіон дозою 0,1 мг/кг, ліпін дозою 0,1 мг/кг, корвітин дозою 0,2 мг/кг, через 12 тижнів роблять забір матеріалу для подальшого ультраструктурного дослідження, визначають щільність нервових волокон і кут їх відхилення від

50 осі травмованого нерва, отримані результати порівнюють з контролем і при зменшенні дегенерації нервових волокон і кровоносних судин, а також зниженні розвитку фіброзу у травмованому нерві оцінюють ефективність регенерації периферійного нерва під впливом ліпофлавіону на пізніх етапах.



фiг.1



фiг.2

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601