

А.С. Лисак

ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ

Надійшла: 07.07.2019

Прийнята: 24.08.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.66-69>

УДК:612.017.1+616.833-002

ВПЛИВ ПУНКТАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ВІДНОВЛЕННЯ ПОШКОДЖЕНОГО СІДНИЧОГО НЕРВА (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Lysak A.S. ✉ The effect of bonemarrow puncture on the sciatic nerve injury repair (experimental study).

State Institution "Institute of Traumatology and Orthopedics of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Background. Problem of poor recovery efficiency of the damaged peripheral nerve is associated with prolonged nerve fiber regeneration and late reinnervation. Use of autologous bone marrow punctate is suggested for trophic support and stimulation of distal nerve in the path of nerve fiber sprouting. **Objective.** Investigate the effect of bone marrow aspirate on regeneration of the damaged sciatic nerve with simultaneous and delayed injection. **Methods.** Complete neurotomy and two end-to-end nerve sutures were applied and modeled on rabbit model. In group 1, only the nerve suture, in group 2, autologous bone marrow punctate was additionally administered, in group 3, punctate was injected 7 weeks after nerve suture. Histological and morphometric methods evaluated nerve regeneration at the level of nerve suture and 5-6 cm at 8, 12 and 18 weeks after surgery. **Results.** In group 1, 2 and 3 after 8 weeks nerve in the distal segment was recovered at the level of 20.8%, 33.3% and 41.6%; in 12 weeks - 41.6%, 72.9% and 75.0%; after 18 weeks - 47.9%, 77.1% and 72.9%. Regeneration significantly increased in the period 8-18 weeks in the nerves of group 1, and in groups 2 and 3 recovery was significantly faster, but the density of nerve fibers did not reach the values in the nerves of pseudoperated animals. **Conclusions.** The use of autologous bone marrow punctate stimulates regeneration of the surgically restored sciatic nerve, increasing density of nerve fiber regeneration and their myelination. Introduction of punctate immediately after the injury stimulates the recovery process to a greater extent than the delayed injection, but the difference is detected only in early stages of recovery. **Key words:** sciatic nerve, trauma, end-to-end suture, bone marrow punctate, morphology, morphometry.

Citation:

Lysak AS. [The effect of bonemarrow puncture on the sciatic nerve injury repair (experimental study)]. Morphologia. 2019;13(3):66-9. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.66-69>

✉ dr.andrew.lysak@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Проблема відновлення травматично пошкоджених нервів кінцівок не втрачає своєї актуальності. Незважаючи на значні досягнення мікрохірургічної техніки функціональні результати відновлення високих пошкоджень нервів стовбурів часто не дають бажаного результату [1]. Поліпшенню регенерацію периферійних нервів після мікрохірургічного відновлення сприяє застосування екзогенних лікарських засобів і факторів. Розглядається можливість застосування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку для підвищення регенерації нервів та трофічної підтримки денервованих м'язів кінцівок [2]. Під дією мезенхімальних клітин відбувається пригнічення

атрофії скелетних м'язів, збільшується регенерація нервових волокон та експресія гліальних маркерів у нерві [3].

Мета роботи – дослідити вплив аспірату кісткового мозку на регенерацію пошкодженого сідничого нерва при одночасному та відтермінованому введенні.

Матеріали та методи

Експерименти проведено на кроликах масою 3-4 кг. Тварини були розділені на 4 групи по 3 тварини у групі (на кожний термін експерименту): група псевдооперованих тварин та 3-ї групи дослідних тварин. Псевдооперованим тваринам здійснювали ревізію та мобілізацію правого сідничого нерва на рівні проксимальної третини стегна і зашивали поле доступу до нерва.

Дослідним тваринам (група 1) здійснювали мобілізацію і нейротомію правого сідничного нерва на рівні проксимальної третини стегна, шов правого сідничного нерва. Монофіламентною хірургічною ниткою що не розсмоктується ETHICON PROLENE® 7/0 (Johnson's Johnson Inc) накладено два шва нерва по типу кінець-в-кінець з використанням мікрохірургічної техніки. З метою погіршення умов реіннервації шов нерва накладено через всю товщу нерва, зі значним натягом, та без адаптації кінців нерва. Виконано ушивання шкіри безперервним обвивним швом з використанням монофіламентної хірургічної нитки що не розсмоктується COROLENE® 2/0 (Peters SURGICAL). Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом Стерилліум® класікпур (виробництво BODE Chemie GmbH, Німеччина). Тваринам групи 2 після виконання шва нерва вводили очищений пунктат кісткового мозку в задню групу м'язів гомілки (m. soleus та m. gastrocnemius) справа. Тваринам групи 3 очищений пунктат вводили через 7 тижнів після шва нерва.

Протокол одержання пунктату кісткового мозку.

У 5 мл шприц набрано 0,2 мл 4% розчину Цитрату натрію. За допомогою голки діаметром 1,2 мм виконано прокол шкіри в проекції великого вертлюга стегнової кістки. За допомогою провідника товщиною 0,9 мм – голку прочищено від залишків кістки що потрапили у середину голки. До голки під'єднано шприц, та виконано забір 2 мл пунктату кісткового мозку. Голку видалено, місце проколу оброблене дезінфектантом Стерилліум® класікпур (виробництво BODE Chemie GmbH, Німеччина). Пунктат кісткового мозку очищено від частинок спонгіозної кісткової тканини завдяки фільтру-подрібнювачу для аспірату підшкірної жирової клітковини Tulip® Emulsifier TM. До шприца з очищеним пунктатом кісткового мозку під'єднано ін'єкційну голку товщиною 0,6 мм. Очищений пунктат кісткового мозку введено в задню групу м'язів гомілки (m. soleus та m. gastrocnemius) справа.

Тварин виводили з експерименту через 8, 12 і 16 тижнів після виконання шва нерва шляхом швидкої декапітації. Сідничний нерв було відібрано для гістологічного дослідження. Зразки нерва довжиною 7-8 см фіксували у 10%-розчині нейтрального формаліну. Після фіксації виділяли два фрагменти нерва: на рівні 0-0,5 см від шва і 5-6 см від шва. Одержували криозрізи товщиною 15 мкм і імпрегнували азотнокислим сріблом для виявлення нервових волокон. Морфометричний аналіз полягав у оцінці щільності регенерованих нервових волокон у нервових стовбурах [4]. Статистичне дослідження проведено з використан-

ням програми OriginLab version 8.0. Міжгрупову різницю оцінювали за непараметричним критерієм Крускала-Уоліса. Дані представлено у вигляді медіани з розподілу кuartилів (M[Q1-Q3]). Різницю між групами вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

За результатами гістологічних досліджень у всіх дослідних тварин групи 1-3 встановлено регенерацію нервових волокон через ділянку шва. На рівні шва нерва виявлено проксимальний і дистальний сегменти нерва, регенерацію волокон у дистальні сегменти та поодинокі новоутворені тонкі нервові стовбури. Епіневрій фасцикулів нерва був збережений. Ділянка навколо шва та між кінцями нерва була активованими нейроремоцитами (дедиференційовані, проліферуючі гліоцити). Регенерація нервових волокон на рівні шва була неоднорідною, їх щільність зростала при проростанні у фасцикули дистального сегмента. Нервові волокна у ділянках невроми часто змінювали напрям регенерації, реєстрували поодинокі рекурентні волокна та так звані спіралі Перрончіто. Регенерація нервових волокон зростала з терміном експерименту. У таблиці 1 наведено результати кількісної оцінки нервових волокон на рівні шва і через 5-6 см. На 8 тижнів щільність нервових волокон у дистальному сегменті нерва групи 1 становила в середньому 45,8% і 20,8%; у групі 2 – 66,7% і 33,3%; у групі 3 – 52,1% і 41,6% ($P < 0,05$). На 12 тижнів показник становив: група 1 – 54,1% і 41,6%; група 2 – 75,0% і 72,9%; група 3 – 81,2% і 75,0% ($P < 0,05$). На 18 тижнів показник становив: група 1 – 66,7% і 47,9%; група 2 і 3 – 77,1% і 72,9% ($P < 0,05$). Регенерацію у дистальному сегменті нерва ілюструє рисунок 1.

Статистичні дослідження показали достовірне зростання щільності регенеруючих нервових волокон у нервах групи 1 у термін 8-18 тижнів, а у групі 2 і 3 між терміном 8 і 12 тижнів (різниця між 12 і 18 тижнем не було). Показники у групах 2 і 3 були достовірно більшими від групи 1, але не досягали значень у нервах псевдооперованих тварин. Між групами порівняння 2 і 3 статистично більшим був показник у початковому сегменті дистального відрізка нерва (на рівні 0-0,5 см) групи 2 на 8 тижнів щодо групи 3 ($P < 0,05$), тобто при введенні пунктату кісткового мозку безпосередньо після виконання шва нерва, але у наступні терміни різниці не виявлено. **Висновки**

Застосування аутологічного пунктату кісткового мозку стимулює регенерацію хірургічно відновленого сідничного нерва, збільшуючи щільність регенерації нервових волокон та їх мієлінізацію.

Введення пунктату безпосередньо після травми стимулює відновні процеси у більшій

мірі, ніж при відтермінованому введенні, але різницю виявлено тільки на ранніх етапах

відновлення.

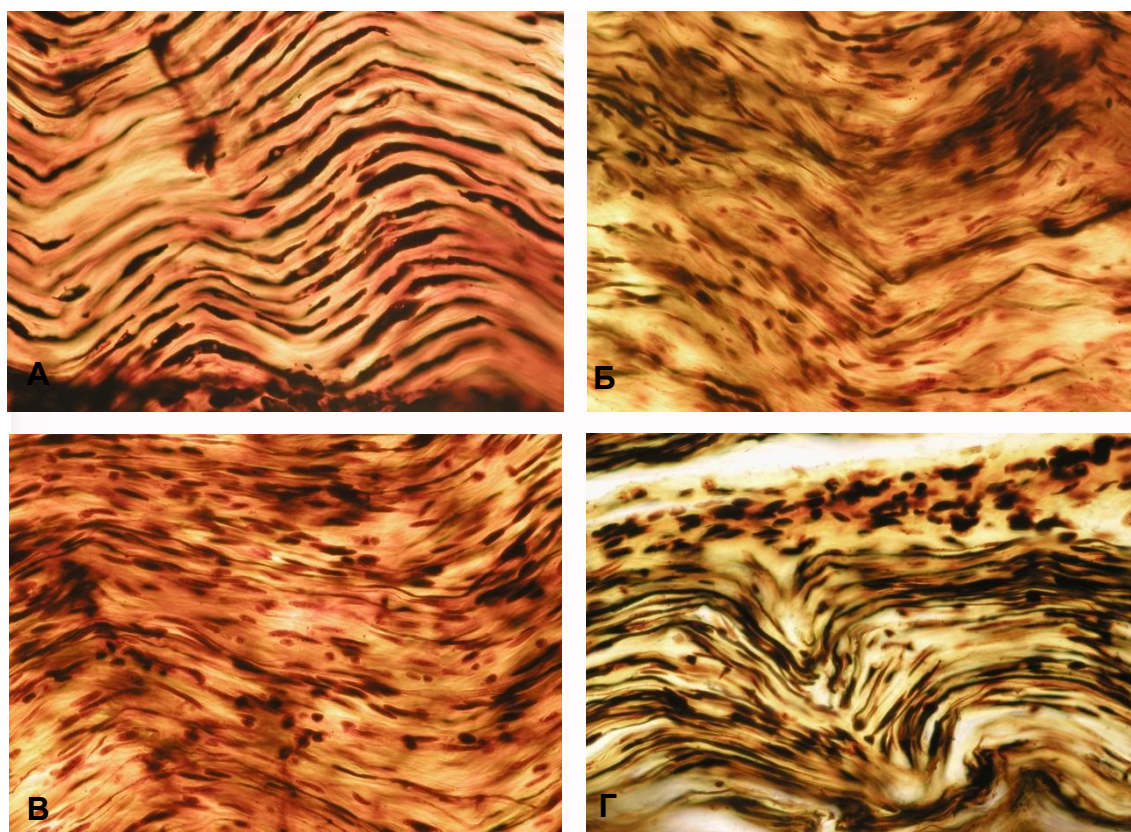


Рис. 1. Регенерація сідничного нерва через 18 тижнів після пошкодження. Дистальний сегмент нерва, 5-6 см від шва нерва: а – група псевдооперованих тварин; б – група 1; в – група 2; г – група 3. Збільшена щільність нервових волокон у групі 2 і 3. Імпрегнація азотнокислим сріблом, $\times 400$.

Таблиця 1

Рівень регенерації сідничного нерва після пошкодження (щільність нервових волокон у дистальному сегменті нерва, $\text{од}/\text{мм}^2$, Me[Q1-Q3])

Група	Термін після пошкодження					
	8 тижнів		12 тижнів		18 тижнів	
Відстань від шва	0-0,5 см	5-6 см	0-0,5 см	5-6 см	0-0,5 см	5-6 см
П/о	9411,7 [7843,1-9803,9]					
Група 1	4313,7 [3039,2- 4901,9] *	1960,7 [1176,4- 3235,2] *	5098,0 [4215,6- 6666,7] *	3921,5 [1862,7- 6470,5]	6274,5 [5000,0- 7843,1] *	4509,8 [3431,3- 6470,5] *
Група 2	6274,5 [5392,1- 7058,8] *#	3137,2 [2352,9- 4705,8] *#	7058,8 [5294,1- 9019,6] *#	6862,7 [5784,3- 7843,1] *#	7254,9 [6274,5- 7941,1] *#	6862,7 [6274,5- 7843,1] *#
Група 3	4901,9 [3823,5- 6274,5] *^	3921,5 [2745,0- 4803,9] *#	7647,0 [6274,5- 8627,4] *#	7058,8 [6274,5- 7843,1] *#	7254,9 [6568,6- 7843,1] *#	6862,7 [6176,4- 7549,0] *#

Примітка: П/о – псевдооперовані тварини; * - до п/о ($P < 0,05$); # - до групи 1 ($P < 0,05$); ^ - до групи 2 ($P < 0,05$).

Перспективи подальших розробок полягають у дослідженні гіпотрофії скелетних м'язів гомілки та їх реіннервації у різні терміни

відновлення сідничного нерва та застосування аспірату кісткового мозку.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент

публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Palispis WA, Gupta R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. *ExpNeurol*. 2017;290:106-114.
2. Yu Z, Xu N, Zhang N, Xiong Y. Repair of Peripheral Nerve Sensory Impairments via the Transplantation of Bone Marrow Neural Tissue – Committed Stem Cell – Derived Sensory Neurons. *Cell Mol Neurobiol*. 2019;39(3):341-353.
3. Abbas OL, Özatik O, Gönen ZB, Koçman

AE, Dağ I, Özatik FY, Bahar D, Musmul A. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation Enhances Nerve Regeneration in a Rat Model of Hindlimb Replantation. *Plast Reconstr Surg*. 2019;143(4):758e-768e.

4. Gumenyuk A, Rybalko S, Ryzha A, Savosko S, Labudzynski D, Levchuk N, Chaikovskiy Y. Nerve regeneration in conditions of HSV-Infection and an antiviral drug influence. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018; 301:1734-1744.

Лисак А.С. Вплив пунктату кісткового мозку на відновлення пошкодженого сідничого нерва (експериментальне дослідження).

РЕФЕРАТ. Актуальність. Проблема низької ефективності відновлення пошкодженого периферійного нерва пов'язана з тривалою регенерацією нервових волокон та пізньою реіннервацією. Застосування аутологічного пунктату кісткового мозку пропонується для трофічної підтримки та стимуляції дистального нерва на шляху проростання нервових волокон. **Мета:** дослідити вплив аспірату кісткового мозку на регенерацію пошкодженого сідничого нерва при одночасному та відтермінованому введенні. **Методи.** Кроликам моделювали повну нейротомію та накладали два шва нерва по типу кінець-в-кінець. У групі 1 лише звивали нерв, у групі 2 додатково вводили аутологічний пунктат кісткового мозку, у групі 3 пунктат вводили через 7 тижнів після шва нерва. Гістологічними та морфометричними методами оцінювали регенерацію нерва на рівні шва нерва і через 5-6 см через 8, 12 і 18 тижнів після операції. **Результати.** У групі 1, 2 і 3 через 8 тижнів регенерував нерв у дистальний сегмент на рівні 20,8%, 33,3% і 41,6%; через 12 тижнів - 41,6%, 72,9% і 75,0%; через 18 тижнів - 47,9%, 77,1% і 72,9%. Регенерація достовірно зростала у термін 8-18 тижнів у нервах групи 1, а у групі 2 і 3 відновлення було достовірно швидшим, але щільність нервових волокон не досягала значень у нервах псевдооперованих тварин. **Висновки.** Застосування аутологічного пунктату кісткового мозку стимулює регенерацію хірургічно відновленого сідничого нерва, збільшуючи щільність регенерації нервових волокон та їх мієлінізацію. Введення пунктату безпосередньо після травми стимулює відновні процеси у більшій мірі, ніж при відтермінованому введенні, але різницю виявлено тільки на ранніх етапах відновлення.

Ключові слова: сідничий нерв, травма, шов кінець-в-кінець, пунктат кісткового мозку, морфологія, морфометрія.

Лысак А.С. Влияние пунктата костного мозга на восстановление поврежденного седалищного нерва (экспериментальное исследование).

РЕФЕРАТ. Актуальность. Проблема низкой эффективности восстановления поврежденного периферического нерва связана с длительной регенерацией нервных волокон и поздней реиннервацией. Применение аутологичного пунктата костного мозга предлагается для трофической поддержки и стимуляции дистального нерва на пути прорастания нервных волокон. **Цель:** исследовать влияние аспирата костного мозга на регенерацию поврежденного седалищного нерва при одновременном и отсроченном введении. **Методы.** Кроликам моделировали полную нейротомию и накладывали два шва нерва по типу конец-в-конец. В группе 1 только свивали нерв, в группе 2 дополнительно вводили аутологичный пунктат костного мозга, в группе 3 пунктат вводили через 7 недель после шва нерва. Гистологическими и морфометрическими методами оценивали регенерацию нерва на уровне шва нерва и через 5-6 см через 8, 12 и 18 недель после операции. **Результаты.** В группе 1, 2 и 3 через 8 недель регенерировал нерв в дистальный сегмент на уровне 20,8%, 33,3% и 41,6%; через 12 недель - 41,6%, 72,9% и 75,0%; через 18 недель - 47,9%, 77,1% и 72,9%. Регенерация достоверно возрастала в срок 8-18 недель в нервах группы 1, а в группе 2 и 3 восстановление было достоверно быстрее, но плотность нервных волокон не достигала значений в нервах псевдооперованных животных. **Выводы.** Применение аутологичного пунктата костного мозга стимулирует регенерацию хирургически восстановленного седалищного нерва, увеличивая плотность регенерации нервных волокон и их миелинизацию. Введение пунктата непосредственно после травмы стимулирует восстановительные процессы в большей степени, чем при отсроченном введении, но разница обнаружена только на ранних этапах восстановления.

Ключевые слова: седалищный нерв, травма, шов конец-в-конец, пунктат костного мозга, морфология, морфометрия.