## Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ**

**імені академіка А.П. РОМОДАНОВА АМН УКРАЇНИ»**

**МЕДВЕДЄВ ВОЛОДИМИР ВІКТОРОВИЧ**

УДК 617.832-001-089.843-003.93:

616-74:[615.46+611.813-018.1]:57.08

**ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ СИНТЕТИЧНОГО МАКРОПОРИСТОГО ГІДРОГЕЛЮ ТА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН НЮХОВОЇ ЦИБУЛИНИ НА ПРОЦЕСИ РЕГЕНЕРАЦІЇ СПИННОГО МОЗКУ ПІСЛЯ ЙОГО ТРАВМАТИЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

14.01.05 – нейрохірургія

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2008

**Дисертацією є рукопис**.

Робота виконана у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор,

член-кореспондент АМН України

**Цимбалюк Віталій Іванович,**

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, завідувач кафедри нейрохірургії;

Державна установа «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П.Ромоданова АМН України», заступник директора з наукової роботи, керівник відділу відновної нейрохірургії

**Офіційні опоненти**: доктор медичних наук, професор

**Сташкевич Анатолій Трохимович,**

Державна установа «Інститут травматології та ортопедії АМН України», завідувач відділу хірургії хребта зі спінальним (нейрохірургічним) центром

доктор медичних наук

**Хижняк Михайло Віталійович,**

Державна установа «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова АМН України», завідувач відділення лазерної та ендоскопічної спінальної нейрохірургії

Захист відбудеться « 1 » липня 2008 р. о 1200 годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01 у Державній установі «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова АМН України» за адресою: 04050, м. Київ, вул. Мануїльского, 32.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова АМН України» (04050, м. Київ, вул. Мануїльского, 32).

Автореферат розіслано « 30 » травня 2008 р.

Вчений секретар Спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01,

к.мед.н., ст.н.с. **С.Г. Дунаєвська**

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** На даний час у світі проживає близько 2,5 млн хворих, що перенесли спинномозкову травму, і щорічно реєструється 130 тис нових випадків (S. Thuret та співавт., 2006). Контингент спінальних хворих на 75% складається з чоловіків працездатного віку. Близько 80% хворих, що перенесли тяжку хребетно-спинномозкову травму залишаються прикутими до інвалідного візка і потребують спеціалізованого догляду протягом усього наступного періоду життя (В.И. Сипитый, 2001). Зважаючи на це відновлення функції спинного мозку після його травматичного ушкодження набуває важливого значення не лише як медична, але і як соціальна проблема.

Відновлення функції спинного мозку пов’язане із компенсаторною трансформацією структури рухової системи, регенерацією аксонів провідних шляхів, а також із відтворенням нейрональних популяцій на рівні ушкодження. Згідно з сучасними уявленнями ефективність відновного лікування наслідків травми спинного мозку тісно пов’язана з відтворенням сукупності морфофункціональних зв’язків між елементами тканини у ділянці ушкодження та за її межами за допомогою різноманітних варіантів клітинної та тканинної трансплантації. Серед останніх найбільш перспективними вважається використання трансплантації клітинних суспензій різного походження та складу, а також імплантації штучних полімерних носіїв у ділянку травми.

Суміш клітин різних типів та різного рівня диференціювання з наявністю особливо важливих для відновлення провідникового апарату спинного мозку нюхових огортаючих гліоцитів (НОГ) можна отримати при культивуванні тканини нюхової цибулини (НЦ) (S. Pagano та співавт., 2000). Позитивний ефект трансплантації НОГ в зону ураження спинного мозку виявляли на ранніх термінах після моделювання його повного перетину (A. Ramon-Cueto та співавт., 1998) та перетину дорзальних стовпів (M.I. Chuah та співавт., 2004) у нижньогрудному відділі спинного мозку, а також у віддаленому періоді спінальної травми (N. Keyvan-Fouladi та співавт., 2003). Водночас, відсутність позитивного впливу НОГ на регенераційний ріст аксонів відмічали на моделях DREZ-томії (L.M. Ramer та співавт., 2004) та забиття спинного мозку (J.E. Collazos-Castro та співавт., 2005). У деяких роботах було продемонстровано, що трансплантація олігодендроцитів у проміжному періоді спінальної травми на моделі забиття у нижньогрудному відділі спинного мозку на відміну від трансплантації НОГ супроводжується слабопозитивним ефектом (T. Takami та співавт., 2002).

При цьому слід зауважити, що трансплантація клітинних суспензій в зону ушкодження не може слугувати методом вибору у випадку травми, що супроводжується діастазом тканини спинного мозку по всій ширині чи в окремій частині його поперечного перерізу. Тому вивчення ефективності трансплантації полімерного матеріалу – в ділянку дефекту, та клітин НЦ – у прилягаючі зони збереженої тканини спинного мозку є актуальним питанням в контексті розробки клінічно прийнятних методів відновного лікування наслідків травматичного пошкодження спинного мозку.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в межахкомплексної науково-дослідної теми „Розробити засоби відновлення провідності спинного мозку за допомогою імплантації полімерних матеріалів та клітин нюхової цибулини” (номер державної реєстрації 0107U001192), котра виконується на базовій установі кафедри нейрохірургії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця ДУ „Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова АМН України” протягом 2007–2009 рр.

**Мета дослідження:** вивчення впливу імплантації синтетичного макропористого гідрогелю та трансплантації клітин нюхової цибулини (ТКНЦ) на процеси регенерації спинного мозку після його травматичного пошкодження в експерименті.

**Завдання дослідження:**

* вдосконалити модель однобічного половинного перетину (ОПП) спинного мозку для вивчення впливу імплантації гідрогелю на відновні процеси, що мають місце при цьому варіанті травматичного пошкодження;
* вивчити вплив імплантації гідрогелю в зону травматичного пошкодження спинного мозку на динаміку стану моторної сфери експериментальних тварин;
* визначити особливості патоморфологічних змін у тканині спинного мозку, що виникають у випадку його однобічного половинного перетину та після імплантації гідрогелю в зону травматичного пошкодження;
* вивчити особливості динаміки електрофізіологічних характеристик нервово-м’язового апарату задніх кінцівок у випадку моделювання ізольованої травми спинного мозку запропонованим методом та після імплантації гідрогелю в зону пошкодження;
* вивчити особливості впливу ТКНЦ на динаміку функціональної активності задніх кінцівок та електрофізіологічні характеристики нервово-м’язового апарату у випадку моделювання ізольованої травми спинного мозку вказаним методом, а також після імплантації гідрогелю в зону ОПП.

**Об’єкт дослідження:** тяжкі травматичні ушкодження спинного мозку.

**Предмет дослідження:** вплив імплантації гідрогелю та трансплантації клітин нюхової цибулини на процеси регенерації спинного мозку після моделювання його однобічного половинного перетину.

**Методи дослідження.** *Експериментальний*: моделювання тяжкого травматичного пошкодження спинного мозку, шляхом його лівобічного половинного перетину (ЛПП) у нижньогрудному відділі, з послідуючою негайною імплантацією гідрогелю в зону травми та проведенням ТКНЦ у віддаленому періоді травматичного процесу; спостереження за динамікою неврологічних порушень у експериментальних тварин; отримання та тривале культивування клітин НЦ зрілих щурів. *Морфологічний*: проведення світлової та електронної мікроскопії з метою порівняльного вивчення перебігу травматичного процесу за умови імплантації гідрогелю та ТКНЦ. *Електрофізіологічний*: здійснення кількісної оцінки електричної активності та функції проведення збудження в межах нервово-м’язового апарату шляхом комп’ютерної електронейроміографії. *Статистичний*: опрацювання на персональному комп’ютері первинних даних, отриманих при вивченні функціональної активності задніх кінцівок та під час електрофізіологічного дослідження і встановлення достовірності відмінностей отриманих для різних експериментальних груп результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів:**

* вдосконалено модель ОПП спинного мозку і вперше використано її для вивчення ефективності імплантації досліджуваного варіанту гідрогелю;
* запропоновано та вперше використано метод аналізу динаміки стану моторної сфери тварин на основі обрахунку показника швидкості зміни функції задніх кінцівок, що поглибило уявлення про фазність перебігу відновного процесу при даному варіанті травматичного пошкодження спинного мозку;
* поглиблено уявлення про особливості впливу імплантації гідрогелю на процеси організації у спинному мозку після його травматичного пошкодження;
* встановлено особливості динаміки електрофізіологічних характеристик нервово-м’язового апарату у випадку ізольованого моделювання травми та після імплантації гідрогелю на часовому інтервалі 1–32 тиж;
* вивчено особливості впливу ТКНЦ на динаміку показника функції задніх кінцівок;
* вперше виявлено особливості впливу ТКНЦ на електрофізіологічні характеристики нервово-м’язового апарату у випадку моделювання ізольованої травми та після імплантації гідрогелю;
* запропоновано патофізіологічний механізм, що пояснює особливості впливу імплантації гідрогелю та ТКНЦ на процеси компенсації втрачених функцій після травматичного ушкодження спинного мозку;
* на основі отриманих даних запропоновано патогенетичне обґрунтування можливості клінічного використання методу імплантації гідрогелю та ТКНЦ з метою відновного лікування наслідків травматичного пошкодженнях спинного мозку.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані дані поглиблюють знання про перебіг посттравматичного регенераційного процесу у спинному мозку. Позитивний ефект імплантації гідрогелю та ТКНЦ, отриманий на моделі травматичного пошкодження спинного мозку, виявляє доцільність використання цих методів при розробці нових клінічних варіантів відновного лікування наслідків спінальної травми.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є власним науковим дослідженням автора. Сумісно з науковим керівником,проф., д.мед.н. В.І. Цимбалюком визначені мета та завдання роботи, обговорено результати дослідження та сформулювано висновки. Автором самостійно проведено аналіз вітчизняної та закордонної літератури, а також аналіз патентної ситуації стосовно теми дослідження, вдосконалено модель травматичного пошкодження спинного мозку, розроблено протокол проведення імплантації гідрогелю та ТКНЦ, виконано експериментальні дослідження, проведено облік, обробку та інтерпретацію даних моніторингу функції задніх кінцівок, проаналізовано результати дослідження. Сумісно із д.мед.н. В.М. Семеновою проведено дослідження культуральних властивостей клітин НЦ, а також культивування клітин НЦ у присутності промітотичних факторів росту і передтрансплантаційну підготовку суспензійних культур. Сумісно з проф., д.мед.н. Л.Л. Чеботарьовою та Л.М. Сулій проведено електрофізіологічне дослідження стану нервово-м’язового апарату. Сумісно з д.мед.н. В.М. Семеновою проведено світлооптичне патоморфологічне дослідження тканини спинного мозку тварин різних експериментальних груп та здійснено аналіз отриманих даних. Сумісно з проф., д.мед.н. А.Т. Носовим та В.В. Васлович проведено електронно-мікроскопічне дослідження тканини спинного мозку тварин різних експериментальних груп і здійснено аналіз отриманих даних. Сумісно з А.П. Черкасом проведено статистичну обробку первинних цифрових даних.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені на ІІІ-му з’їзді трансплантологів України (Донецьк, 2004), Всеросійській науково-практичній конференції „Поленовские чтения” (Санкт-Петербург, Росія, 2007), 61-ій Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених „Актуальні проблеми сучасної медицини” (Київ, 2007).

Апробація дисертаційної роботи відбулася на засіданні кафедри нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О.Богомольця МОЗ України (протокол №8 від 5 грудня 2007 р.), а також на спільному засіданні Вченої ради Державної установи «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова АМН України» та кафедр нейрохірургії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л Шупика МОЗ України та Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (протокол №1 від 4 січня 2008 р.).

**Публікації.** Результати дисертаційного дослідження висвітлені у 6 друкованих наукових працях: 3 статтях у фахових виданнях, включених до переліку ВАК України, та 3 тезах доповідей, представлених на національних та міжнародних з’їздах і науково-практичних конференціях.

**Структура та об’єм дисертації.** Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, підсумку, висновків, додатків та списку використаних джерел. Робота викладена на 290 сторінках друкованого тексту, проілюстрована 159 рисунками. Список використаних джерел включає 254 найменувань, з них 21 — кирилицею та 233 — латиницею. Робота доповнена 4 додатками, у яких наведені результати статистичної обробки первинних цифрових даних, викладені у 65 таблицях.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ**

**Матеріали та методи**. Отримання, культивування та морфологічне дослідження клітин НЦ щура здійснювали згідно з загальноприйнятими протоколами культивування нервової тканини (В.П. Божкова та співавт., 1988). Для збагачення культур проліферативно активними клітинами нейрогенного типу отриману суспензію культивували в живильному середовищі DMEM (Dulbecco’s modіfіed Eagle’s medіum, Sigma) стандартного складу, що включало фетальну телячу сироватку (40%), глюкозу (800 мг/%), інсулін (0,2 ОД/мл), з наявністю рекомбінантного епідермального фактору росту людини (hEGF, експресований *E. colі*; Sіgma) у концентрації 40 нг/мл і рекомбінантного фактору росту фібробластів людини (hFGF, експресований *E. colі*; Sіgma) у концентрації 20 нг/мл.

Макропористий гідрогель (полі[*N*-(2-гідроксипропіл)-метакриламід]) був синтезований в лабораторії E. Pinet (FISO Technologies Inc., Quebec, Canada) шляхом гетерогенної полімеризації із наступним очищенням у спиртових і водяних ваннах, після чого гідрогель стерелізували у дистильованій воді шляхом автоклавування і запаювали в скляні ємності. Росфасований в стерильних умовах після транспортування гідрогель утримували протягом усього експерименту при температурі 6–8° С. Вміст однієї пробірки використовували для імплантації 4–6 тваринам протягом одного операційного дня.

Вивчення ефективності імплантації гідрогелю та алотрансплантації клітин НЦ на моделі ЛПП спинного мозку проводили на білих безпородних щурах-самцях, вагою 250–300 г та середнім віком 5–6 міс. У ході дослідження були сформовані наступні експериментальні групи: *група „контроль”* – моделювання ЛПП спинного мозку (n=24); *група „гідрогель”*, тваринам якої безпосередньо після нанесення травми в ділянку ушкодження спинного мозку імплантували гідрогель (n=37); *група*, тваринам якої через 4 тиж після нанесення травми й імплантації гідрогелю в тканину спинного мозку та навколишній субарахноідальний простір вводили суспензію клітин НЦ (n=12); *група*, тваринам якої через 8 тиж після нанесення травми й імплантації гідрогелю в тканину спинного мозку та навколишній субарахноідальний простір вводили суспензію клітин НЦ (n=8); *група*, тваринам якої через 7 тиж після нанесення травми в тканину спинного мозку та навколишній субарахноідальний простір вводили суспензію клітин НЦ (n=4); *група*, тваринам якої через 13 тиж після нанесення травми в тканину спинного мозку та навколишній субарахноідальний простір вводили суспензію клітин НЦ (n=4). Група тварин, котрим через 4 тиж після моделювання травми та імплантації гідрогелю трансплантували клітини НЦ була розділена на *дві підгрупи*: тварини із кращими (n=5) та гіршими (n=7) показниками відновлення функції задньої іпсилатеральної місцю травми кінцівки (ЗІК) на момент виконання ТКНЦ. Для порівняльної оцінки даних електрофізіологічного дослідження провідності спинного мозку було сформовано групу інтактних тварин (n=11).

У якості моделі травматичного пошкодження спинного мозку була використана модель його лівобічного половинного перетину (ЛПП) в нижньогрудному відділі. Оперативні втручання здійснювали під загальним знеболенням, що досягалося шляхом внутрішньоочеревинно введення суміші розчинів ксилазину (Sedazіn, Bіowet, Польща) з розрахунку 15 мг/кг маси і кетаміну (Calypsol, Gedeon Rіchter) з розрахунку 70 мг/кг маси. Ламінектомію проводили на рівні ТXI, зберігаючи при цьому суглобові відростки. Після наскрізного проколу офтальмологічним списоподібним скальпелем тканини спинного мозку вздовж лівого краю задньої серединної артерії (лезо скальпеля знаходилося у сагітальній площині, а рукоятка – перпендикулярно дорзальній поверхні спинного мозку) у рану спинного мозку заводили одну з бранш офтальмологічних ножиць таким чином, щоб при повному їх відкритті в проміжку між браншами потрапляла тканина усієї лівої половини поперечника спинного мозку (ножиці встановлювали рукоятковою частиною в площині поперечного перерізу спинного мозку, перпендикулярно дорзальній його поверхні). В декілька прийомів проводили перетин тканини лівої половини поперечника спинного мозку. Контроль повноти перетину проводили за допомогою скривленого по ребру офтальмологічного пінцета.

В область дефекту тканини спинного мозку імплантували фрагмент гідрогелю. Протибактеріальну терапію здійснювали за допомогою одноразового введення необхідної дози біциліну-3 або біциліну-5. У якості протизапальної і протинабрякової терапії використовували введення розчину дексаметазону.

Техніка формування доступу на рівні ТXII–LI під час повторного втручання з приводу ТКНЦ аналогічна описаній вище. Клітинну суспензію вводили в тканину спинного мозку на вказаному рівні нижче місця травми за допомогою інсулінового шприца як гомолатерально, так і контрлатерально по відношенню до вогнища травми в загальному об’ємі 0,075 мл (~2,25×106 живих клітин). Окрім цього, клітинну суспензію вводили в субарахноідальний простір у ділянці сформованого операційного доступу в об’ємі 0,06 мл (~2×106 живих клітин).

Оцінку функціональної активності задніх кінцівок прооперованих тварин проводили згідно із 21-бальною шкалою, запропонованою D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (ВВВ, 1995). З метою встановлення більш тонких особливостей динаміки відновного процесу проводили дослідження величини швидкості зміни показника функції (ПФ): швидкість зміни ПФ (бали/тижні) = ПФ станом на кінець попереднього тижня – ПФ станом на кінець наступного тижня.

З метою коректного висвітлення ефективності ТКНЦ вибірки зрівняння формували з урахуванням спектру індивідуальних значень ПФ ЗІК на момент проведення ТКНЦ.

*Електрофізіологічне дослідження* здійснювали під загальним знеболенням (див. вище). Широко відкривали канал хребта на рівні ТIII–TV, мобілізували спинний мозок вздовж двох сегментів і під його вентральну поверхню перпендикулярно ростро-каудальній осі підводили 2 паралельні гачкоподібні кінці стимулюючого сталевого електроду.

Реєструючі активний та пасивний голкові сталеві електроди встановлювали у товщу рухової точки бічного широкого м’язу стегна обох кінцівок. Стимуляцію та обробку первинних результатів проводили за допомогою електронейроміографа з системою комп’ютерного аналізу потенціалів B.A.S.I.S. Е.Р.М. (OTE Biomedica, Італія). Для подальшого аналізу відбиралися найвищі отримані впродовж дослідження однієї тварини показники. При цьому визначали такі показники електричної активності нервово-м’язового апарату, як максимальна амплітуда (МА) М-відповіді м’язу, латентний період реєстрації та швидкість проведення збудження (ШПЗ).

*Статистичну обробку* первинних цифрових даних здійснювали на персональному комп’ютері за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0 та пакету MS Exel. Під час порівняльної оцінки результатів моніторингу функції задніх кінцівок встановлювали достовірність різниці середнього бального показника у порівнюваних групах та підгрупах за допомогою непараметричного методу U-тест Мана-Уітні (Mann-Whitney U-test).

Під час статистичної обробки результатів електрофізіологічного дослідження у кожній із вибірок проводили перевірку на нормальність розподілу змінної за допомогою тесту Шапіро-Уілка (Shapiro-Wilk test), після чого достовірність різниці між середніми показниками вибірок встановлювали за допомогою t-тесту.

*Гістологічні та електронно-мікроскопічні дослідження* проводили згідно із загальноприйнятими протоколами (Г.А. Меркулов, 1961; Г. Гайер, 1974). Імуногістохімічне дослідження експресії віментину в клітинних культурах здійснювали за допомогою стандартного набору “Immunochemicals” (Sigma).

Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлооптичного мікроскопа Axiophot (OPTON, Німеччина) та цитоаналізатора зображення IВAS-2000 (KONTRON, Німеччина) з наступною цифровою та аналоговою фотореєстрацією. Електронно-мікроскопічне дослідження проводили на електронному мікрокопі ЕМ-400Т (PHILIPS, Нідерланди).

**Результати та їх обговорення.** Використання моделі ЛПП у даному дослідженні дозволило провести коректну оцінку впливу імплантації гідрогелю на провідники та нейрональні клітини спинного мозку у ранньому періоді спінальної травми з урахуванням віддаленого функціонального ефекту, що за ряду об’єктивних причин неможливо здійснити на моделях повного перетину або забиття спинного мозку.

Порівняння результатів ОПП, представлених різними дослідницькими групами (C.D. Mills та співавт., 2001; Y.S. Gwak та співавт., 2004), з отриманими нами даними дає можливість стверджувати, що використаний протокол моделювання ОПП з огляду на поставлені завдання дослідження є найбільш прийнятним і забезпечує максимальне наближення посттравматичного дефіциту функції ЗІК до дефіциту функції задніх кінцівок, що виникає після повного перетину спинного мозку на аналогічному рівні. Використання запропонованої моделі ОПП дало змогу виділити у групах „контроль” та „гідрогель” дві рівновеликі підгрупи: із кращими та гіршими показниками відновлення функції ЗІК. При цьому аналогічність варіативного розподілу величини ПФ у групах „контроль” та „гідрогель” відкрила можливість проведення адекватного порівняльного статистичного аналізу між вказаними підгрупами.

Станом на 16-ий тиждень спостереження було отримано наступні дані щодо величини середнього ПФ у групах „контроль” та „гідрогель”. Стосовно ЗІК: 7,23 проти 4,69 (в загальному по групах „гідрогель” і „контроль” відповідно) (рис. 1), 2,88 проти 0,59 (підгрупи груп „гідрогель” та „контроль” із гіршими показниками відновлення) та 10,26 проти 8,23 балів ВВВ (підгрупи груп „гідрогель” і „контроль” із кращими показниками відновлення). Стосовно ЗКК: 13,03 проти 10,6 (в загальному по групах „гідрогель” і „контроль” відповідно) (рис. 2), 12,41 проти 10,45 (підгрупи груп „гідрогель” та „контроль” із гіршими показниками відновлення) та 13,17 проти 10,73 балів ВВВ (підгрупи груп „гідрогель” і „контроль” із кращими показниками відновлення). Отже, згідно із цими даними, імплантація гідрогелю призводить до достовірного покращення функції задніх кінцівок, що станом на 16-ий тиждень у різних досліджуваних вибірках виражається величинами у межах 2–2,54 бала ВВВ.

**Рис. 1**. Динаміка величини середнього показника функції ЗІК у групах „гідрогель” та „контроль” (ЛПП). **Тут і надалі примітки: \* - різниця достовірна (р<0.05), \*\* - різниця достовірна (р<0.01).**

**Рис. 2**. Динаміка величини середнього показника функції ЗКК у групах „гідрогель” та „контроль” (ЛПП).

Інваріантність величини позитивного впливу імплантації гідрогелю на відновлення функції задніх кінцівок знаходить адекватне пояснення. Відомо, що зростання складності функціональної активності кінцівки супроводжується залученням все більшого об’єму волокон та інтернейронного апарату спинного мозку (H. Majczynski, U. Slawinska, 2007). Регенераційні перебудови при ушкодженні певної частини спинного мозку здійснюються в межах апарату, який повністю чи частково причетний до генерування функціональної активності цієї частини інтактного спинного мозку. Отже, чим глибше ураження вказаної частини спинного мозку, тим менший об’єм її функціонального апарату залишається неушкодженим, тим нижчий рівень її функціональної активності, однак, тим менші можливості регенераційного відновлення. І, навпаки, при більшому об’ємі збереження спостерігається більш високий рівень функціональної активності ушкодженої функціональної частини спинного мозку, що потребує більш широких пластичних перебудов для досягнення позитивного результату, однак це стає можливим лише у тій мірі, в якій широта регенераційних змін визначається об’ємом первинної збереженості нервових структур.

Порівняльний аналіз динаміки середньої величини ПФ задніх кінцівок у різних підгрупах дозволив виділити у посттравматичному періоді кілька фаз (рис. 3), що пов’язані, на нашу думку, із етапною реалізацією різних механізмів відновного процесу.

Перша фаза відновлення функції спинного мозку триває протягом 1-го тижня після нанесення травми і пов’язана, на нашу думку, із відновленням функції провідності волокон, що зазнали найменш значного ураження. Друга фаза (2-3-ій тиждень – у групі „гідрогель” та 3-4 тиж у групі „контроль”) характеризується, на нашу думку, відновленням волокон, котрі зазнали більш значного, демієлінізуючого впливу. Суттєві відмінності у поведінці показника швидкості відновлення функції задніх кінцівок груп „гідрогель” та „контроль”, дозволяють стверджувати, що імплантація гідрогелю призводить до зростання частки волокон, котрі зазнали слабкого ураження за рахунок зменшення частки волокон, що отримали більш значне ураження.

Третя фаза інтенсифікації відновного процесу припадає на 4-ий тиждень в обох групах і, очевидно, відображає результативність не лише відновлення волокон, що зазнали демієлінізуючого впливу (більш характерно для групи „контроль”), але й у деякій мірі – пластичних перебудов систем низхідного проведення збудження.

**Рис. 3**. Динаміка швидкості відновлення функції ЗІК у групах „гідрогель” та „контроль” (ЛПП).

Четверта фаза у випадку групи „контроль” припадає на 7–9-ий тиждень спостереження, тоді як у групі „гідрогель” її ініціація прослідковується уже на 5-му тижні і тривалість обмежується кінцем 8-го тижня спостереження. У цій фазі виявляється втрата спряженості між об’ємом збереженості субстрату регенераційного процесу та функціональною результативністю перебудов, що вказує на високе значення реалізації таких механізмів прояву пластичності нейрональних сіток, як формування довгих розгалужень нейритів під час спраутингу, регенераційне проростання аксональних відростків у каудальні відділи спинного мозку тощо. Виходячи із даних порівняльного аналізу динаміки ПФ на цьому інтервалі відновного процесу, слід визнати, що гідрогель позитивно впливає на перебіг вказаних трансформацій, прискорюючи їх ініціацію. Ці висновки знаходить підтвердження і у даних морфологічних досліджень, котрі свідчать, що ніжна сполучна тканина в товщі гелевого імплантату, а також у складі оточуючої капсули, починаючи з 3-го тижня після імплантації, стає зоною проростання волокон дрібного та середнього калібру.

Вторинні альтераційні реакції, що розгортаються у контрлатеральній частині спинного мозку, призводять до різкого зниження ПФ ЗКК в обох підгрупах групи „контроль” протягом перших 2-ох тиж. Таке зниження не виявляється у жодній із підгруп тварин, котрим проводили ЛПП у поєданні з імплантацією гідрогелю.

Отже, імплантація гідрогелю в ранньому періоді травматичного процесу чинить протекторний вплив на елементи провідникового апарату та нейрональні клітини сірої речовини спинного мозку, а також сприяє регенераційному росту нервових волокон шляхом забезпечення процесу організації із переважним залученням сполучнотканинних компонентів.

При аналізі даних електрофізіологічного дослідження тварин групи „контроль” виявляється настання піку середньої величини МА М-відповіді у досліджуваному м’язі ЗІК наприкінці 7-го тижня спостереження (рис. 4). Середня величина МА М-відповіді у групі „гідрогель” на 7-му тижні виявляється достовірно нижчою, аніж у групі „контроль”. Максимальне значення цього показника у групі „гідрогель” реєструється лише на 26 тижні спостереження (рис. 4).

Станом на 23-ій тиждень спостереження у групі „контроль” виявляється достовірне зниження середньої величини М-відповіді досліджуваного м’язу ЗІК. Менш виражена регресія цього показника у групі „гідрогель” спостерігається на 31 тижні (рис. 4).

**Рис. 4**. МА М-відповіді у м’язі ЗІК на різних термінах спостереження у групах „контроль” (ЛПП), „гідрогель”, а також у випадку ТКНЦ, проведеної на 7-му та 13-му тижні після ЛПП.

Динаміка середніх значень ШПЗ та латентного періоду реєстрації збудження, що визначалася стосовно ЗІК, в обох експериментальних групах проявляє спряженість із динамікою середньої величини МА М-відповіді досліджуваного м’язу ЗІК. При цьому у випадку імплантації гідрогелю виявляються 2 максимуми ШПЗ: на 7-му (недостовірний) та 26-му (достовірний) тижні спостереження.

На підставі отриманих даних можна стверджувати, що імплантація гідрогелю призводить до розчленування динаміки електрофізіологічних показників, описаної для групи „контроль”, із формуванням трьох фаз: первинного росту (1–7 тиж), стабілізації (7–23 тиж), декомпенсації і кінцевої регресії (24–31 тиж).

Отримані дані узгоджуються із результатами морфологічного дослідження і дозволяють провести їх узагальнену інтерпретацію шляхом побудови патофізіологічної моделі процесів, що виникають після ЛПП спинного мозку та у випадку імплантації гідрогелю.

Слід відмітити, що внаслідок значного перекриття полів інервації гілок периферійних нервів, полісегментарності інервації окремих м’язів, автономізації функціональної активності відділів спинного мозку, розташованих нижче місця його травматичного пошкодження, а також внаслідок відновлення провідності збудження альтернативними шляхами з використанням інтернейронного апарату (при неповному ураженні поперечника спинного мозку) існування стану абсолютного виключення нервових впливів на окремо взятий до розгляду м’яз при моделюванні спінальної травми можна вважати вкрай сумнівним. Гіпертрофія рухових одиниць (РО), інервація яких залишилась збереженою, супроводжується значним зростанням амплітуди та тривалості М-відповіді (Б.М. Гехт та співавт., 1997). Тривала надмірна функціональна активність цих РО, а також пов’язаного із ними мотонейронного та інтернейронного апарату спинного мозку, стає головним чинником їхнього виснаження та наступної дегенерації, що спричиняє зниження реєстрованої МА М-відповіді.

Одним із головних чинників регенераційного процесу впродовж перших 7-ми тиж є формування найкоротших ланцюгів альтернативної передачі збудження через довговідросткові пропріоспінальні інтернейрони (F.M. Bareyre та співавт., 2004). Отже, необхідне аутогенне підвищення ШПЗ може досягатися лише шляхом підвищення збудливості інтернейронного апарату спинного мозку, що сприяє виникненню синдрому посттравматичної спастичності.

Вірогідно, що у випадку імплантації гідрогелю описані процеси набувають менш інтенсивного виразу, що виливається у помірне зростання величин МА М-відповіді та ШПЗ, обрахованих для ЗІК, протягом перших 7-ми тижнів спостереження.

Враховуючи первинний протекторний вплив гідрогелю на провідниковий та нейрональний апарат спинного мозку, а також зважаючи на отримані дані щодо проростання дрібних аксональних розгалужень у товщу сполучнотканинних компонентів гелевого імплантату починаючи з 3-го тижня, можна стверджувати, що у випадку імплантації гідрогелю широта функціонуючого мотонейронного апарату нижче місця травми переважає аналогічний показник у тварин групи „контроль”. Це обумовлює більш широке покриття інерваційними впливами кожного із м’язів ЗІК і певним чином обмежує об’єм залучення інтернейронного апарату у формування альтернативних шляхів проведення збудження. Однак, тимчасове налагодження прямої провідності по гомолатеральним волокнам через зону імплантації гідрогелю супроводжується зниженням швидкості передачі збудження (у першу чергу через дрібний діаметр новоутворених волокон у зоні імплантату) і демотивацією процесу становлення альтернативних шляхів проведення. Водночас, формування актів рухової активності ЗІК можливе, на нашу думку, лише за умови надходження усієї необхідної низхідної інформації, частина якої, очевидно, передається саме через вказані регенеруючі волокна. Їх присутність, таким чином, підвищує час, необхідний для формування електричного збудження у мотонейронах передніх рогів спинного мозку нижче місця травми, тобто знижує показники ШПЗ у групі „гідрогель” в порівнянні із групою „контроль” станом на 7-ий тиждень спостереження.

Слід очікувати, що подальша організація тканини імплантату, галузіння та подрібнення нервових волокон у товщі гідрогелю на фоні тривалого прагнення рухової системи до збільшення ефективності передачі збудження та функціонування мотонейронального апарату нижче місця травми призводить до поступового зростання активності пропріоспінальних інтернейронів з метою забезпечення проведення збудження в обхід зони трансплантату, залучення регенеруючих волокон у товщі імплантату до вогнищ підвищеної електричної активності. При цьому, як показали дані електронно-мікроскопічного дослідження, на більш віддалених термінах спостереження навколо новоутворених мієлінізованих нервових волокон формуються щільні колагенові футляри, що, вірогідно, є причиною порушення їхньої трофіки та прискорення дегенерації. В сумі своїй ці процеси, на нашу думку, є головною причиною виключення провідності по сектору волокон, що брали участь у формуванні проростань через товщу гідрогелю, а відтак – зниження функції інервованих за їхньою участю мотонейронів нижче місця травми. Цій стадії відповідає очікуване зниження ШПЗ, що виявляється на 23-му тижні спостереження.

Наступаюча за цим вторинна компенсаторна гіпертрофія РО, котрі залишилися у активно функціонуючому стані, супроводжується достовірним зростанням величини МА М-відповіді, що виявляється на 26-му тижні експерименту. На цей момент, очевидно, припадає закінчення формування додаткової частини альтернативних шляхів проведення та підвищення його швидкості механізмами, описаними вище для апарату інервації ЗІК групи „контроль”, що виливається у достовірний пік ШПЗ на 26-му тижні у групі „гідрогель”. Подальше зниження показників МА М-відповіді та ШПЗ на прикінцевих термінах спостереження, на нашу думку, можна пов’язувати із віковими змінами.

При виборі терміну проведення ТКНЦ послуговувалися отриманими даними щодо динаміки відновних процесів у групах „контроль” та „гідрогель”. При цьому з метою виявлення ефекту ТКНЦ у вигляді ізольованої у часі активації відновлення функції задніх кінцівок, не пов’язаної з жодною з аутогенних реакцій регенераційного типу, були обрані рівноцінні стосовно відсутності динаміки і максимально наближені до моменту моделювання травми терміни: 8 та 13 тиж після імплантації гідрогелю та після моделювання ізольованого ЛПП відповідно.

Водночас, виходячи із даних численних досліджень (А. Ramon-Cueto та співавт., 1998; N. Keyvan-Fouladi та співавт., 2003; M.I. Chuah та співавт., 2004), ми припускали, що специфічний ефект ТКНЦ нижче місця травми проявляється у найбільшій мірі на стадії активного регенераційного росту аксональних волокон, що пов’язано із специфікою функції НОГ. Ця фаза регенераційного процесу в ізольованому у часі вигляді виявляється на 7–8-му тижні у групі „контроль”, тоді як у групі „гідрогель” дебютує раніше – на 5-му тижні спостереження. Отже проведення ТКНЦ у терміни 4 та 7 тиж тваринам груп „гідрогель” та „контроль” відповідно ставить представників порівнюваних вибірок в однакові початкові умови та дає змогу відслідкувати специфіку дії клітин НЦ за наявності гелевого імплантату або без нього.

Було встановлено, що проведення ТКНЦ через 4 тиж після імплантації гідрогелю супроводжується достовірним підвищенням швидкості відновлення функції ЗІК (рис. 5), що виявляється на 10-му тижні загального спостереження і спричиняє статистично недостовірне покращення загальних результатів відновного процесу на 0,68 бала за шкалою ВВВ. При цьому, починаючи з 4-го тижня після ТКНЦ відмічалося тривале достовірне підвищення швидкості відновлення функції ЗІК у вибірці тварин із нижчими показниками функції ЗІК. У вибірці тварин із вищими показниками функції ЗІК ефект ТКНЦ виявлявся у вигляді достовірного піку швидкості зростання ПФ ЗІК на 8-му тижні загального спостереження.

**Рис. 5**. Динаміка швидкості зміни показника функції ЗІК у випадку ТКНЦ, проведеної через 4 тиж після трансплантації гідрогелю.

Стосовно ЗКК при проведенні ТКНЦ через 4 тиж після імплантації гідрогелю жодного позитивного функціонального ефекту виявлено не було. Аналогічний результат стосовно функції ЗІК та ЗКК спостерігався і у випадку ТКНЦ, здійсненої через 8 тиж після імплантації гідрогелю.

Проведення ТКНЦ через 7 тиж після моделювання ізольованого ЛПП супроводжується виникненням достовірного піку швидкості відновлення функції ЗІК на 5-му тижні після трансплантації, що спричиняє виникнення стабільного у часі статистично недостовірного покращення результатів відновного лікування на 0,88 бала за шкалою ВВВ. Проведення ТКНЦ через 13 тиж після моделювання ЛПП не супроводжується відчутним позитивним функціональним ефектом.

На основі даних електрофізіологічного дослідження можна стверджувати, що ТКНЦ не впливає на часові особливості динаміки величини МА М-відповіді досліджуваного м’язу ЗІК, однак знижує ступінь прояву реакцій, притаманних різним фазам відновного процесу, причому це зниження носить достовірний характер у випадку ТКНЦ після моделювання ізольованого ЛПП (рис. 3). Стосовно контрлатеральної частини нервово-м’язового апарату (ЗКК) такого роду ефект ТКНЦ в обох варіантах застосування (у випадку ізольованого ЛПП та після імплантації гідрогелю в зону ЛПП) був виражений у меншій мірі.

Позитивний ефект ТКНЦ можна описати за допомогою щонайменше трьох механізмів: дестабілізація стійких патологічних топологій нейрональних сіток нижче місця травми; зниження загальної електричної активності у нейрональних ансамблях нижче місця травми і створення умов для реалізації складних форм функціональної активності моторної системи даних відділів спинного мозку; ремієлінізація та відновний ріст аксональних волокон.

Для окреслення кола складових першого із перерахованих механізмів важливо враховувати, що незрілі нейрогенні клітини, потрапляючи у великій кількості в тканину спинного мозку, формують значне поле рецепції та утилізації молекул факторів росту та адгезії. Враховуючи те, що тривале існування патологічних варіантів нейрональних сіток – патофізіологічного субстрату синдрому посттравматичної спастичності – можливе за умови постійної активної продукції факторів росту та адгезії, механізм „дефакторизації” у даному випадку відіграє, на нашу думку, ключову роль у дестабілізації існуючої патологічної структури нейрональних сіток, що призводить до зниження електричної активності мотонейронів спинного мозку.

Іншим можливим механізмом позитивного ефекту ТКНЦ є вплив нащадків прогеніторів НЦ на баланс медіаторних систем в зоні підвищеної електричної активності спинного мозку. Відомо, що прогенітори НЦ *in vitro* та при трансплантації у тканину головного мозку диференціюються в холін-, ГАМК- та дофамінергічні нейрони (S. Pagano та співавт., 2000; E.A. Parati та співавт., 2003). Згідно з отриманими у даному дослідженні даними, у випадку проведення ТКНЦ в стромі імплантату виявляються острівці недиференційованих клітин, а також клітинні комплекси, серед яких визначаються фенотипові ознаки нейробластів. Це може опосередковано свідчити про нейрональне диференціювання прогеніторів НЦ в ділянках їхнього введення та міграційного розповсюдження.

Порівнюючи тривалість елевації величини ПФ ЗІК та ЗКК, пов’язаної із проведенням ТКНЦ, можна дійти висновку, що при такому частковому відновленні функції ЗІК у більшій мірі проявляється вплив ТКНЦ на стан провідникового апарату, тоді як при відновленні функції ЗКК виявлений позитивний ефект опосередковується переважно за рахунок впливу трансплантованих клітин на локальні нейрональні сітки спинного мозку. Швидке ж відновлення регресу ПФ, пов’язаного із проведенням ТКНЦ, вказує на можливий ремієлінізуючий ефект клітин НЦ.

Виходячи із усього вищенаведеного, можна зробити висновок, що гідрогель у описаному в даному дослідженні варіанті застосування проявляє тривалий, в цілому позитивний, однак внутрішньо неоднозначний ефект на відновні процеси у спинному мозку. ТКНЦ як самостійний метод відновного лікування, використаний у більш пізньому періоді розвитку травматичного процесу, проявляє слабкий позитивний функціональний ефект, котрий супроводжується вираженим зниженням надмірної електричної активності у еферентних частинах рухової системи. Сумісне застосування цих двох методів відновного лікування в рамках протоколу, використаного у даному дослідженні, не супроводжується прямою сумацією позитивних ефектів кожного із них, однак підвищує загальну результативність відновного лікування експериментальної травми спинного мозку.

**ВИСНОВКИ**

В дисертації представлене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми відновного лікування наслідків травматичного пошкодження спинного мозку в експерименті, що полягає у використанні імплантації синтетичного макропористого гідрогелю – у ранньому періоді та алогенної трансплантації клітин нюхової цибулини – у віддаленому періоді травматичного процесу.

1. Використана у даному дослідженні вдосконалена модель травматичного пошкодження спинного мозку (ЛПП) є адекватною для дослідження ефективності імплантації синтетичного макропористого гідрогелю і має певні переваги у порівнянні з моделями повного перетину та забиття спинного мозку на аналогічному рівні.
2. Імплантація гідрогелю в зону ЛПП призводить до достовірної переваги величини відновлення функції обох задніх кінцівок у порівнянні з контрольною групою (моделювання ізольованого ЛПП), котра станом на 16-ий тиждень у різних досліджуваних вибірках виражається величинами у межах 2–2,54 бала ВВВ.
3. Імплантація гідрогелю в зону травми одразу ж після моделювання ЛПП чинить протекторний вплив на провідники та нейрональні клітини оточуючої тканини спинного мозку.
4. Організація зони імплантації гідрогелю відбувається за участю елементів ніжного сполучнотканинного матриксу із незначним залученням гліального компоненту, що є головною передумовою провадження регенераційного росту нервових волокон дрібного та середнього калібру у периферійних ділянках гелевого імплантату починаючи з 3-го тижня після імплантації.
5. На більш віддалених термінах спостереження (24–32 тиж) спостерігаються явища мозаїчної дегенерації мієлінізованих волокон спинного мозку нижче рівня ураження на фоні заміщення пухкої сполучної тканини в товщі гелевого імплантату грубим фібротичним компонентом.
6. У випадку ізольованого ЛПП, станом на 7-ий тиждень спостереження виявляється достовірний пік середніх значень МА М-відповіді у досліджуваному м’язі ЗІК, що дисонує із значеннями функціональної активності кінцівки на вказаному етапі спостереження і з цієї причини може розцінюватися як прояв посттравматичного розгальмування мотонейронного апарату спинного мозку нижче рівня ураження та компенсаторної гіпертрофії активних рухових одиниць.
7. Імплантація гідрогелю призводить до розчленування динаміки показників електричної активності, описаної для тварин контрольної групи, із формуванням трьох фаз: первинного росту (1–7 тиж), стабілізації (7–23 тиж), декомпенсації і кінцевої регресії (24–32 тиж).
8. Проведення ТКНЦ через 4 тиж після імплантації гідрогелю та через 7 тиж після моделювання ізольованого ЛПП спричиняє достовірне підвищення швидкості відновлення функції ЗІК, що виявляється на 10–11 тиж загального періоду спостереження.
9. Проведення ТКНЦ через 8 тиж після імплантації гідрогелю та через 13 тиж після моделювання ізольованого ЛПП не супроводжується позитивним ефектом на функціональному рівні.
10. ТКНЦ, особливо у випадку проведення її після моделювання ізольованого ЛПП, призводить до зниження значень МА М-відповіді досліджуваного м’язу ЗІК, не впливаючи на часові характеристики динаміки цього показника.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. *Зозуля Ю.А., Семенова В.М., Лисяный Н.И., Любич Л.Д., Высоцкий Н.С., Стайно Л.П., Медведев В.В.* Потенциальные свойства нейроклеток из обонятельной луковицы человека в условиях культивирования // Український нейрохірургічний журнал. – 2006. – №4. – С.84–88.

(Автор брав участь у формуванні ідеї та методології дослідження, вивченні літературних джерел щодо особливостей біології клітин НЦ, їх культуральних особливостей та можливостей клінічного використання; проводив кількісну оцінку динаміки чисельності клітин в культурі у присутності різних живильних середовищ, а також брав участь у інтерпретації морфологічного матеріалу та формулюванні висновків).

2. *Медведєв В.В.* Вплив трансплантації клітин нюхової цибулини на процеси регенерації спинного мозку після його травматичного пошкодження в експерименті // Український неврологічний журнал. – 2007. – №4. – С. 93–101.

3. *Цимбалюк В.І., Медведєв В.В.* Вплив трансплантації синтетичного макропористого гідрогелю та клітин нюхової цибулини на процеси регенерації спинного мозку після його травматичного пошкодження в експерименті // Журнал АМН України. – 2008. – Т.14, №1. – С. 74–93.

(Автором проведено культивування клітин НЦ в присутності промітотичних факторів росту, вдосконалено методику ОПП спинного мозку щура у нижньогрудному відділі; здійснено імплантацію гідрогелю та ТКНЦ, проведено облік функціональних та електрофізіологічних результатів, їх статистичну обробку та інтерпретацію).

4. *В.М. Семенова, Н.С. Висоцький, В.В. Медведєв, Л.П. Стайно* Морфологічні особливості культивування ольфакторної цибулини як джерела нервових стовбурових клітин постнатального мозку // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №7 (Додаток). – Матеріали ІІІ З’їзду трансплантологів України (6–8 жовтня 2004 р., Донецьк). – С. 350–353.

(Автор брав участь у формуванні ідеї та методології дослідження, вивченні літературних джерел щодо особливостей біології клітин НЦ, їх культуральних особливостей та можливостей клінічного використання, а також у інтерпретації морфологічного матеріалу та формулюванні висновків щодо особливостей впливу досліджуваних факторів на нейрогенез в культурі).

5. *Медведєв В.В.* Посттравматичне відновлення функції спинного мозку після трансплантації синтетичного макропористого гідрогелю та клітин нюхової цибулини. // Укр. наук.-мед. молодіжний журнал. – 2007. – №3 (Спец. вип., присвяч. 61-й Міжнар. наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених „Актуальні проблеми сучасної медицини”). – С. 115.

6. *Цымбалюк В.И., Семенова В.М., Яминский Ю.Я., Медведев В.В.* Посттравматическое восстановление функций спинного мозга на фоне трансплантации полимерного материала гелевого типа // Поленовские чтения: Материалы всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 150-летию со дня рождения В.М. Бехтерева (24–27 апреля 2007 г., Санкт-Петербург). – СПб., 2007. – С. 79.

(Автором проведено виділення та культивування клітин НЦ в присутності промітотичних факторів росту, вдосконалено методику ОПП спинного мозку щура у нижньогрудному відділі, здійснено моделювання травматичного пошкодження вказаним чином, імплантацію гідрогелю та ТКНЦ; проведено облік результатів функціонального моніторингу та електрофізіологічного дослідження, їх статистичну обробку, а також інтерпретацію морфологічного матеріалу).

**АНОТАЦІЯ**

**Медведєв В.В.** – „Вплив імплантації синтетичного макропористого гідрогелю та трансплантації клітин нюхової цибулини на процеси регенерації спинного мозку після його травматичного пошкодження в експерименті”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.05 — нейрохірургія. Державна установа «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова АМН України», м. Київ, 2008 р.

Дисертація присвячена проблемі відновного лікування наслідків травматичного пошкодження спинного мозку в експерименті.

В роботі проведено дослідження відновного ефекту імплантації синтетичного макропористого гідрогелю та внутрішньотканинної алогенної трансплантації клітин нюхової цибулини (ТКНЦ) після моделювання лівобічного половинного перетину (ЛПП) спинного мозку безпородних щурів-самців віком 5,5 міс та вагою 250–300 г. Імплантацію гідрогелю в зону ЛПП проводили зразу ж після моделювання травми. ТКНЦ в тканину спинного мозку нижче місця травми здійснювали через 7 та 13 тиж після моделювання ЛПП, а також через 4 та 8 тиж після імплантації гідрогелю. Станом на 16-ий тиждень спостереження імплантація гідрогелю призводить до достовірного покращення функції задніх кінцівок на 2–2,44 бала за шкалою ВВВ у порівнянні з тваринами, що перенесли ізольоване ЛПП. Проведення ТКНЦ через 4 тиж після імплантації гідрогелю та через 7 тиж після ЛПП призводить до виникнення достовірного піку швидкості зростання функції задньої іпсилатеральної кінцівки на 4–6 тиж по відношенню до вибірок порівняння. Імплантація гідрогелю супроводжується формуванням фазної динаміки показників електричної активності: фаза зростання показників (1–7 тиж); стабілізація (7–23 тиж, у випадку ізольованого ЛПП відсутня); декомпенсація, пік і регресія (24–31 тиж). ТКНЦ, особливо проведена після ізольованого ЛПП, призводить до зниження надмірної електричної активності у еферентних частинах рухової системи.

**Ключові слова**: експериментальна травма спинного мозку, відновна нейрохірургія, синтетичний макропористий гідрогель, нюхова цибулина, нейрогенні клітини, нейротрансплантація, електронейроміографія, аксональний ріст.

**АННОТАЦИЯ**

**Медведев В.В.** – «Влияние имплантации синтетического макропористого гидрогеля и трансплантации клеток обонятельной луковицы на процессы регенерации спинного мозга после его травматического повреждения в эксперименте». – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.05 — нейрохирургия. Государственное учреждение «Институт нейрохирургии имени академика А.П. Ромоданова АМН Украины», г. Киев, 2008 г.

Диссертация посвящена проблеме восстановительного лечения последствий травматического повреждения спинного мозга в эксперименте.

**Цель** – изучить влияние имплантации синтетического гидрогеля и трансплантации клеток обонятельной луковицы (ТКОЛ) на регенерационные процессы в спинном мозге белых беспородных крыс (самцы в возрасте 5,5 мес и массой 250–300 гр) после моделирования его левостороннего половинного пересечения (ЛПП) в нижнегрудном отделе.

**Материалы и методы.** Экспериментальные группы животных: группа „контроль”: моделирование ЛПП спинного мозга в нижнегрудном отделе (n=24); группа „гидрогель”: имплантация синтетического гидрогеля в зону ЛПП непосредственно после нанесения травмы (n=37); группы, животным которых через 4 (n=12) и 8 (n=8) нед после имплантации гидрогеля в ткань спинного мозга вводили суспензию клеток обонятельной луковицы (ОЛ); группы, животным которых через 7 (n=4) и 13 (n=4) нед после моделирования ЛПП в ткань спинного мозга вводили суспензию клеток обонятельной луковицы (ОЛ). Клетки выделяли из ОЛ зрелых крыс и культивировали в присутствии факторов роста hEGF и hFGF. Учет результатов проводили согласно шкале двигательной активности D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (BBB), с помощью метода электронейромиографии, а также при помощи стандартного комплекса патоморфологических исследований.

**Результаты.** На 16-й неделе после имплантации гидрогеля отмечалось достоверное улучшение функции задних конечностей на 2–2,44 балла по шкале ВВВ в сравнении с животными, перенесшими изолированое ЛПП.

В случае изолированного ЛПП на 7-ой неделе наблюдения определяется достоверный пик средних значений максимальной амплитуды М-ответа, которые диссонируют со значениями показателя функциональной активности задних конечностей на этом этапе наблюдения, что может расцениваться как проявление посттравматического растормаживания мотонейронального аппарата спинного мозга ниже уровня повреждения и компенсаторной гипертрофии активных двигательных единиц исследуемой мышцы задней ипсилатеральной конечности (ЗИК).

Организация зоны имплантации гидрогеля происходит при участии элементов нежного соединительнотканного матрикса при незначительном вовлечении глиального компонента, что является главным условием регенерационного роста миелинизированных волокон малого и среднего калибра в периферических отделах гелевого имплантата начиная с 3-ей недели после имплантации.

Имплантация гидрогеля сопровождается формированием фазной динамики показателей электрической активности: фаза роста (1–7 нед); стабилизация (7–23 нед, в группе „контроль” аналог этой фазы отсутствует); декомпенсация, пик и регрессия (24–31 нед).

Проведение ТКОЛ через 4 нед после имплантации гидрогеля и через 7 нед после моделирования изолированного ЛПП определяет возникновение достоверного пика скорости роста функции ЗИК на 10–12 неделе общего периода наблюдения.

ТКОЛ, проведенная через 8 нед после имплантации гидрогеля и через 13 нед после ЛПП, не сопровождается положительным эффектом на функциональном уровне.

ТКОЛ, особенно в случае проведения ее после моделирования изолированного ЛПП, сопровождается снижением значений МА М-ответа исследуемой мышцы ЗИК, не влияя на временную структуру динамики этого показателя.

**Выводы.** Имплантация гидрогеля оказывает протекторное влияние на нервные волокна и нейрональные клетки прилегающих участков спинного мозга, а также в определенной мере способствует ведению регенерационного роста миелинизированных волокон в зоне посттравматической организации. ТКОЛ, проведенная в отдаленном периоде травматического процесса, проявляет слабоположительный функциональный эффект, который сопровождается снижением чрезмерной электрической активности в эфферентных отделах двигательной системы. Совместное применение этих двух методов восстановительного лечения в рамках протокола, использованного в данном исследовании, не сопровождается прямой суммацией положительных эффектов каждого из них, однако повышает общую результативность лечения последствий экспериментальной травмы спинного мозга.

**Ключевые слова**: экспериментальная травма спинного мозга, восстановительная нейрохирургия, синтетический макропористый гидрогель, обонятельная луковица, нейрогенные клетки, нейротрансплантация, электронейромиография, аксональный рост.

**SUMMARY**

**Medvedjev V.V.** – «The effect of synthetic macroporous hydrogel implantation and olfactory bulb cells transplantation upon the spinal cord regeneration processes after its expiremental traumatic injury» – the manuscript.

The dissertation on scientific degree of the candidate of medical sciences obtaining on a speciality 14.01.05 – neurosurgery. State institution «Institute of neurosurgery named after academician A.P. Romodanov of Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, 2008.

The dissertation is dedicated to a problem of spinal cord restoration after experimental traumatic injury.

The restorative effect of synthetic macroporous hydrogel implantation and allogenic olfactory bulb’ cells transplantation (OBCT) after left-side hemisection (LH) of male rats' (age – 5,5 m; weight – 250–300 g) spinal cord were studied. A hydrogel was implanted into the LH zone immediately. OBCT was made in 4 and 8 weeks after hydrogel implantation and in 7 and 13 weeks after LH only into the spinal cord tissue below the LH site. At the 16th week hydrogel implantation leads to significant hind limb function improvement in 2–2,44 grades of BBB scale. OBCT in 4 weeks after hydrogel implantation and in 7 weeks after LH leads to the appearance of the significance peak of speed of ipsilateral hind limb function increase at the 4th-6th weeks after transplantation. Hydrogel implantation was accompanied by distinctive trisegmental dynamics of electrical activity indices: growth phase (1–7 weeks); stabilization (7–23 weeks, it is absent in the case of isolated LH); decompansation, peak and regression (24–31 weeks). OBCT leads to explicit reduction of excessive electric activity in efferent part of locomotor system.

**Key words**: spinal cord injury models, restorative neurosurgery, synthetic macroporous hydrogel, olfactory bulb, neural progenitor cells, neurotransplantation, electroneuromyographical recording, axonal growth.

**СПИСОК СКОРОЧЕНЬ**

ЗІК – задня іпсилатеральна місцю травми кінцівка

ЗКК – задня контрлатеральна місцю травми кінцівка

ЛПП – лівобічний половинний перетин (спинного мозку)

НОГ – нюхові огортаючи гліоцити

НЦ – нюхова цибулина

МА М-відповіді – максимальна амплітуда М-відповіді

ОПП – однобічний половинний перетин (спинного мозку)

ПФ – показник функції

РО – рухова одиниця

ШПЗ – швидкість проведення збудження

ТКНЦ – трансплантація клітин нюхової цибулини

BBB – шкала Basso-Beattie-Bresnahan

# Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>