## 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"

**ЧОМОЛЯК ЮРІЙ ЮРІЙОВИЧ**

УДК 616.833.15-091.934-003.93-085:615.357.001.4

**ЛОКАЛЬНИЙ ВПЛИВ АПЛІКАЦІЇ ПРОГЕСТЕРОНУ НА РЕМІЄЛІНІЗАЦІЮ ЗОНИ ВХОДУ ТРІЙЧАСТОГО НЕРВА В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

14.01.05 – нейрохірургія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Ужгородському національному університеті Міністерства освіти і науки України.

**Науковий керівник** – доктор медичних наук, професор **Смоланка Володимир Іванович**, Ужгородський національний університет, завідувач кафедри неврології, нейрохірургії та психіатрії

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор **Трош Рустем Меметович**, ДУ “Інститут нейрохірургії імені академіка А.П.Ромоданова АМН України”, завідувач відділення субтенторіальної нейрохірургії

доктор медичних наук, професор **Сон Анатолій Сергійович**, Одеський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії і неврології

Захист відбудеться “26” лютого 2008 р. о 12 годині на засіданні Спеціа­лі­зова­ної вченої ради Д 26.557.01 в ДУ “Інститут нейрохірургії імені ака­де­мі­ка А.П.Ромоданова АМН України” (04050, м.Київ, вул. Мануїльського, 32).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ “Інститут нейрохі­рур­гії імені академіка А.П.Ромоданова АМН України” (04050, м.Київ, вул. Ма­нуїльського, 32).

Автореферат розісланий “25” січня 2008 р.

Вчений секретар Спеціалізованої вченої ради,

доктор медичних наук Л.Л.Чеботарьова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Лікування невралгії трійчастого нерва є ак­туаль­ною медичною проблемою. За даними різних досліджень в країнах Єв­ро­союзу щорічно виявляється від 4 до 27 нових випадків цього за­хво­рювання на 100 тис. населення (Manzoni G.C. et al., 2005; Hall G.C. et al., 2006). Виражений больовий синдром у пацієнтів з цим захворюванням, опи­саний більш ніж 300 років тому (Bausch J.L., 1671), нерідко зали­ша­є­ть­ся стійким до сучасних медикаментів. З розвитком мініінвазивних тех­но­логій своє місце в лікуванні невралгії трійчастого нерва зайняли хірургічні методи (Цимбалюк В.І. та співавт., 2001). Так, метод вибору хірургічного лікування даного захворювання – мікроваскулярна деком­пресія трій­частого нерва – забезпечує відмінні результати протягом пер­шого тижня після втручання у 82% пацієнтів. Проте, через 10 років від­сут­ність больового синдрому без додаткового медикаментозного лікування спо­стерігається лише у 63,5% оперованих (Barker F.G. II, Jannetta P.J., 1996). Підвищення ефективності хірургічних втручань при невралгії трій­частого нерва можливе завдяки розвитку знань про патогенез цього захво­рювання.

За допомогою проведених наприкінці ХХ століття досліджень вста­новлено, що одним з основних чинників розвитку типової невралгії трійчастого нерва є локальна демієлінізація, яка виникає в його корінці під впливом стиснення судиною (Hilton et al., 1994; Love S., Coakham H., 2001; Broggi et al, 2005). Водночас існує припущення, що рідкісні випадки спонтанного видужання пацієнтів з невралгією пов’язані з повноцінною ремієлінізацією трійчастого нерва (Love S., Coakham H., 2001), тоді як недостатнє відновлення мієлінової оболонки розглядається як основна причина рецидивів захворювання після хірургічних втручань (Kitt S. et al., 2000). Відповідно до цього, пошук засобів для повноцінного відновлення мієлінової оболонки нервових волокон є пріоритетним напрямком су­часних досліджень. Рядом авторів доведено, що місцеве застосування прогестерону призводить до посилення ремієлінізації нервових волокон периферичної нервової системи як in vitro, так in vivo (Koenig H. et al., 1995, 2000; Schumacher M. et al., 2001; Ghoumari A. et al., 2005). Виявлено вплив прогестерону на ремієлінізацію також в центральній нервовій системі (Mellon S. et al., 2001).

Вищезазначене обумовлює можливість та доцільність місцевого ви­користання прогестерону під час мікроваскулярної декомпресії трій­час­того нерва з метою забезпечення більш повноцінного відновлення мієлі­нової оболонки корінця трійчастого нерва і, відповідно, покращення результатів хірургічного лікування. Проте переваги такого комбінованого мікрохірургічного лікування можуть бути оцінені з достатнім ступенем вірогідності лише в умовах експерименту на лабораторних тваринах. От­же, необхідним є експериментальне обґрунтування вказаного нейро­хірур­гічного втручання з аплікацією прогестерону та використанням мік­ро­хірургічної техніки.

**Зв’язок роботи з науковими темами і програмами.** Дисертаційне дослідження пов’язане з темою науково-дослідної роботи кафедри невро­логії, нейрохірургії та психіатрії медичного факультету Ужго­род­ського національного університету в 2005-2007 рр. і є фрагментом теми: «Вто­ринна профілактика і прогнозування інсультів та судинних компресійних син­дромів, спричинених церебральним атеросклерозом», номер дер­жре­єс­т­рації 0104U010447.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є посилення ремієлінізації корінця трійчастого нерва шляхом аплікації прогестерону в хронічному експерименті задля вдосконалення мікрохірургічного втручання при невралгії трійчастого нерва.

**Для досягнення мети поставлено такі завдання:**

1. Розробити експериментальну модель сегментарної демієлінізації корінця трійчастого нерва.
2. На моделі сегментарної демієлінізації трійчастого нерва провести серії експериментальних досліджень аплікації прогестерону з вико­ристанням мікрохірургічної техніки та наступним морфологічним дослідженням процесу ремієлінізації зони входу корінця трійчастого нерва.
3. Встановити оптимальний варіант місцевого застосування проге­стерону з метою посилення ремієлінізації зони входу трійчастого нерва в експерименті.

**Об’єкт дослідження –** процеси демієлінізації та ремієлінізації корінця трійчастого нерва.

**Предмет дослідження –** особливості ремієлінізації зони входу корінця трійчастого нерва в експерименті з використанням комбінованого мікрохірургічного втручання.

**Методи дослідження.** Для реалізації мети та завдань роботи проведено наступні дослідження:

1. Хронічний експеримент – змодельовано фокальну демієлінізацію та ремієлінізацію корінця трійчастого нерва морської свинки.
2. Морфологічні – досліджено гістологічні особливості де- та ремієлінізації зони входу корінця трійчастого нерву в експерименті.
3. Гістохімічні – визначено рецептори до КІ-67 у клітин Шванна корінця трійчастого нерва в експерименті.
4. Статистичні – виконано математичну обробку результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше розроблено доступ до корінця трійчастого нерва морської свинки з використанням мікрохірургічної техніки.

Вперше встановлено, що застосування 0,1% розчину броміду етидію вірогідно відтворює локальну дегенерацію мієлінової оболонки корінця трійчастого нерва у морської свинки із збереженням цілісності аксонів.

Вперше розроблено експериментальну модель локальної сегментарної демієлінізації корінця трійчастого нерва морської свинки з використанням розробленого доступу до трійчастого нерва та 0,1% розчину броміду етидію.

Вперше експериментально відтворено процес відновлення мієлінової оболонки корінця трійчастого нерва після його сегментарної демі­єлі­нізації.

З’ясовано вплив різних чинників на ремієлінізацію корінця трій­частого нерва лабораторних тварин та вперше встановлено, що аплікація 2,5% розчину прогестерону на демієлінізовану ділянку покращує від­нов­лення мієлінової оболонки.

**Практичне значення отриманих результатів.** Практична цінність отриманих результатів полягає у методологічному обґрунтуванні запла­нованого хронічного експерименту**.**

Розроблена модель сегментарної демієлінізації є необхідною для дослідження цього процесу в корінці трійчастого нерва, а також для ви­значення можливостей посилення ремієлінізації даної частини нервової системи.

Експериментально підтверджено стимулюючий вплив аплікації 2,5% розчину прогестерону на ремієлінізацію трійчастого нерва, що об­ґрун­товує подальші клінічні дослідження місцевого застосування про­ге­стерону під час хірургічних втручань у хворих з невралгією трійчастого нерва.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним науковим дослідженням автора. Дисертанту належить його ідея, він самостійно провів інформаційно-патентний пошук і аналіз літератури, організував наукове дослідження, разом з науковим керівником професором Смоланкою В.І. сформулював мету, завдання та план дисертаційної роботи. Автором самостійно розроблено модель сегментарної демі­єлінізації корінця трійчастого нерва, самостійно виконано експе­риментальну частину роботи, спільно з завідувачем відділу па­томорфології ДУ "Інститут нейрохірургії імені академіка А.П.Ро­моданова АМН України", д.мед.н., професором М.І.Шамаєвим та старшим науковим співробітником цього відділу, к.мед.н. Т.А.Малишевою здійснено морфологічні та імуногістохімічні до­слідження. Дисертант особисто провів статистичну обробку отриманих результатів, разом з науковим керівником піддав аналізу результати дослідження, сформулював висновки. Автор самостійно оформив дисертаційну роботу.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені на конференції нейрохірургів України "Нові технології в нейрохірургії" (Ужгород, 2006), науково-практичній конференції неврологів України (Харків, 2007), спільному засіданні Закарпатського осередку Асоціації нейрохірургів України та обласного товариства неврологів (Хуст, 2007). Дисертація пройшла апробацію на розширеному засіданні Вченої ради ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ро­моданова АМН України" сумісно з кафедрами нейрохірургії Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика МОЗ України та Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця МОЗ України, членами Української асоціації нейрохірургів 13 липня 2007 року.

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи представлені у 6 публікаціях, з них дві статті у фахових наукових журналах, один патент України (2007 р.), дві статті у фахових виданнях, що містять огляд літератури та власні спостереження, одні тези доповіді на конференції нейрохірургів України, один позитивний висновок на патент України (2007 р.).

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 136 сторінок, з яких 120 сторінок тексту, а також 51 ілюстрація та 6 таблиць, які займають менше однієї сторінки. Список використаних джерел нараховує 152 найме­ну­вання.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

**Дизайн дослідження.** Дослідження ремієлінізації зони входу корінця трійчастого нерва проведено у вигляді експерименту, який складався із двох етапів (рис.1).

На першому етапі розроблено експериментальну модель сегментарної токсичної демієлінізації корінця трійчастого нерва – особливої форми дегенерації мієлінової оболонки, яка характерна для пацієнтів з невралгією – з підтвердженням цього процесу на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях. Крім того, модель дозволяла якнайкраще оцінити вплив прогестерону на процес ремієлінізації. Відомо, що перші ознаки демієлінізації при місцевому застосуванні броміду етидію виявляються на 7 добу після введення цього гліотоксину з максимально вираженими змінами на 14 добу. В цей строк під час морфологічних досліджень вже виявляють ознаки початкової ремієлінізації у вигляді поодиноких клітин Шванна поміж аксонів, оточених базальною мембраною та колагеновими волокнами (Woodruff R., Franklin J., 1999; Riet-Correa G., 2002). Вплив прогестерону на ремієлінізацію найбільш ефективний саме в цей період, оскільки відомо, що його дія спрямована на стимуляцію вже існуючої ремієлінізації, а не на ініціалізацію цього процесу (Koenig H.L. et al., 1995).

Рис. 1. Дизайн дослідження.

Другий етап був присвячений дослідженню впливу прогестерону на відновлення мієлінової оболонки після експериментальної демієлінізації. Розроблена експериментальна модель дозволила застосувати розчин прогестерону в момент початкової ремієлінізації, тобто на 14 добу після введення розчину броміду етидію. Протягом 15 наступних діб лабораторні тварини знаходились під спостереженням у звичному для них середовищі. На 29 добу після початку експерименту морські свинки обох груп були виведені з експерименту, препарати їх трійчастих нервів досліджені за допомогою світлової та електронної мікроскопії. Отримані результати порівняно з даними імуногістохімічних досліджень у цих групах.

**Статистична обробка результатів.** Відповідно до кількості вибірок (дві групи морських свинок) та характеру даних всередині груп (кількісні та якісні ознаки з нормальним розподілом варіант) оптимальними способами статистичної обробки результатів нашого дослідження були: один з варіантів t-критерію Стьюдента та критерій χ2 Пірсона. Враховуючи те, що значення частот виявлення якісних показників інколи були менше 5, а кількість спостережень – 20, замість критерію χ2 Пірсона було використано точний критерій Фішера-Ірвіна (Бабич П.Н. та ін, 2004). Вказані обчислення виконувались за допомогою статистичних комп’ютерних програм.Статистична обробка частини морфометричних даних проводилась з використанням пакета стандартних ліцензійних програм до програмно-апаратного комплексу “Leica Microsystems CMS GmbH” (Німеччина, 2007).

**Етичні норми**. План та зміст експериментальних досліджень розроблялися у відповідності до українських (наказ МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. "Про міри по подальшому вдосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин") та міжнародних (General Laboratory Practice (1981), конвенція Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях № 123 (1986), директива Єврокомісії № 86/609 (1986)) стандартів, були схвалені етичною комісією Ужгородського національного університету (протокол № 6 від 04.12.2006).

**Лабораторні тварини.** При порівнянні різних видів експериментальних тварин найбільш зручним виявилось використання статевозрілих морських свинок (Cavia porcellus) вагою 200-350 г обох статей. Тварини були виведені у віварії Ужгородського національного університету і утримувались в стандартних умовах з вільним доступом до води та корму. Загальна кількість тварин становила 52 особини з однаковою кількістю самок та самців. Необхідний рівень знеболення та знечулення досягався внутрішньом’язовим введенням розчину кетаміну, в якому містилося близько 10 мг діючої речовини в комбінації з інфільтрацією шкіри в ділянці розрізу 2% розчином лідокаїну. Виведення морських свинок з експерименту виконувалось шляхом інгаляції токсичних доз етилового ефіру після внутрішньом’язевої ін’єкції 0,1 мл 5% розчину кетаміну.

**Спосіб демієлінізації.** За матеріалами огляду літератури нами було встановлено, що для запланованого дослідження експериментальна демієлінізація корінця трійчастого нерва може бути відтворена шляхом аплікації 0,1 та 0,05% розчинів броміду етидію об’ємом 1 мкл на вказану ділянку нерва. При подальшому порівнянні патоморфологічних змін корінців трійчастих нервів у відповідь на застосування вказаних вище речовин встановлено, що ушкодження мієлінової оболонки в залежності від концентрації броміду етидію характеризувалося частковим (локаль­ним) або поширеним розволокненням і порушенням впо­рядкованості ламел на тлі вогнищевого або поширеного міжламелярного набряку різного ступеню виразності, злипанням ламел з наступним го­могенним їх набуханням на певному відрізку, частковим розщепленням ламел з прийманням спотворених у порівнянні з контролем форм (хвилясті, спіралеподібні, везикулярні утворення), повним розщепленням та лізисом мієлінових оболонок на певному відрізку корінця. Виявлено деякі гліоцити, які беруть участь у фагоцитозі мієліну. Останній розміщується у їх цитоплазмі у вигляді спіралеподібних або кільцеподібних утворень. Патологічні зміни в аксонах виявляються в помірному зморщуванні осьового циліндра на тлі явищ периаксонального набряку, реактивно-деструктивних змінах ультраструктурних органел, зокрема, мітохондрій (фрагментації крист та вогнищевої їх вакуолізації) і частковому про­світленні аксоплазми внаслідок втрати окремих нейрофіламентів (таб. 1).

Таблиця 1

**Ознаки демієлінізації під впливом броміду етидію**

**на субмікроскопічному рівні**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ознака демієлінізації, ступінь значимості різниці між групами за критерієм Фішера-Ірвіна | Концентрація розчину броміду етидію | |
| 0.1% n=10 | 0.05% n=10 |
| Поширене розволокнення і порушення впорядкованості ламел мієліну, p<0.003 | + | - |
| Виражений міжламелярний набряк, р<0.01 | + | - |
| Повне розщеплення та лізис мієлінових оболонок, р<0.001 | + | - |
| Часткове просвітлення аксоплазми, p<0.003 | + | - |
| Зморщення осьового циліндра на тлі явищ периаксонального набряку | + | + |
| Фрагментація та вогнищева вакуолізація крист мітохондрій | + | + |

Дані, наведені в таб. 1, свідчать про залежність дегенеративних змін міє­лінової оболонки від концентрації розчину броміду етидію. При цьому слід звернути увагу на те, що тільки 0,1% розчин вказаного гліотоксину ви­кликає повне розщеплення та лізис мієлінових оболонок одночасно із збере­женням структури осьових циліндрів. Це найбільш адекватно відтво­рює процес сегментарної демієлінізації зони входу корінця трійчастого нер­ва в ділянці стиснення артерією у хворих з невралгією, дозволяючи про­во­дити експериментальні дослідження способів посилення ремієлі­нізації трійчастого нерва.

**Хірургічний доступ до зони входу корінця трійчастого нерва.** Для розробки мікрохірургічного доступу до корінця трійчастого нерва морської свинки було порівняно підходи до цієї структури через середню та задню черепні ямки. Порівнювались відстань від шкіри до тріґемінального корінця, наявність важливих для життєдіяльності тварини структур при виконанні доступу та простір для виконання маніпуляцій поблизу трійчастого корінця. Виявилось, що відстань від шкіри до корінця трійчастого нерва є меншою при доступі через середню черепну ямку. Доступ через задню черепну ямку передбачає маніпуляції із стовбуром мозку, каудальною групою черепно-мозкових нервів, сигмовидним синусом, що суттєво ускладнює хірургічну техніку втручання. Окрім вищевказаного, пе­ре­вагою доступу через середню черепну ямку є більший об’єм простору для маніпуляцій поблизу тріґемінального корінця.

Було розроблено хірургічний доступ до зони входу вказаного нерва мор­ської свинки, при якому трепанація черепа здійснювалась за допо­могою мінідрелі та стоматологічних борів, використовувався операційний мікроскоп Carl Zeiss OPMI із збільшенням 14× та мікроінструментарій. Доступ передбачає трепанацію черепа екс­пе­риментальної тварини в тім’яно-скроневій ділянці діаметром до 0,8 см. При цьому зручним орієнтиром є скронева лінія, як вентральна межа трепанаційного вікна. Розтин твердої мозкової оболони виконувався мікроскальпелем пара­лель­но поперечному синусу. В субдуральному просторі цієї ділянки знахо­диться невелика кількість ліквору. Після ретракції скронево-потиличної частки головного мозку морської свинки медіально добре видно по­перечний синус із впадаючими в нього венами, тенторіум та мозочок. Вод­ночас з’являється значна кількість церебро-спінальної рідини, ас­пірація якої давала змогу продовжувати ретракцію. На певному етапі ві­зуалізувався трійчастий вузол та вирізка намету мозочка. Після розтину останнього значно збільшувався простір для маніпуляцій поруч з корінцем трійчастого нерва. Між наметом мозочка, стовбуром мозку та прок­си­мальною частиною корінця трійчастого нерва за допомогою мікропінцета вста­новлювався матеріал з волокнистого тефлону.

В результаті розтину лабораторних тварин та макроскопічного дослідження їх головного мозку виявлено, що прокладка з волокнистого тефлону, яка була встановлена морським свинкам за допомогою розробленого доступу знаходиться навколо ділянки входу трійчастого нерва у стовбур мозку та щільно прилягає до його корінця. Тканина головного мозку морських свинок, яка оточувала тефлонову прокладку, звичайного кольору та консистенції, її судинний малюнок не змінений. Таким чином, запропонований мікрохірургічний доступ до корінця трійчастого нерва морських свинок забезпечує необхідний простір для виконання маніпуляцій у вказаній ділянці без пошкодження оточуючих мозкових структур.

**Експериментальна модель токсичної демієлінізація корінця трій­час­того нерва.** Через 4 години після операції всі тварини ходили, вжи­ва­ли воду та твердий корм. У післяопераційному періоді протягом 13 діб вжи­вання води не відрізнялось порівняно з контрольною групою, нато­мість споживання корму було меншим. Поведінкові реакції на подраз­нен­ня (дотик до тварини) відновлювались повністю на другу добу після втру­чан­ня. У всіх випадках корнеальний рефлекс був знижений на боці опера­ції порівняно з протилежним боком (таб. 2).

Таблиця 2.

**Результати спостереження за тваринами**

**протягом 13 діб після операції**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | Споживання води | Споживання твердого корму | Реакції у відповідь на дотик (2 доба після операції) | Корне-альний рефлекс |
| Дослідна група  (20 тварин) | самки | ~ 340 мл | менше 24 г | збережені | знижений на боці операції |
| самці | ~ 340 мл | менше 24 г | збережені | знижений на боці операції |
| Контрольна група  (12 тварин) | самки | ~ 340 мл | 24 г | збережені | симе-тричний з обох боків |
| самці | ~ 340 мл | 24 г | збережені | симе-тричний з обох боків |

Слід відзначити відсутність неприйнятного для проведення екс­пе­ри­менту токсичного впливу броміду етидію на організм морської свинки у ви­щевказаних дозах.

Кількість броміду етидію, яка використовувалась для індукції деміє­лінізації у морської свинки, не викликає значимого для результатів експерименту загальнотоксичного впливу. У післяопераційному періоді спостерігався мінімальний неврологічний дефіцит, що підтверджує достовірність експериментальних досліджень та дає змогу викори­стову­вати експериментальну модель протягом тривалого часу.

На світлооптичному рівні ознаками сегментарної демієлінізації при фарбуванні оглядовими методиками (гематоксилін-еозін, гематоксилін-пікрофуксин) були виражені дистрофічні зміни нерва у вигляді так званої вакуольної дистрофії. При застосуванні методу Кульчицького підтвер­дженням демієлінізації зі збереженням цілісності аксонів було порушення мієлоархітектоніки. Характерні для сегментарної демієліні­зації зміни отримано при забарвленні суданом ІІІ за методом Горделадзе у вигляді порушення структури ліпідвмісних оболонок.

При електронномікроскопічному дослідженні корінців трійчастих нервів морських свинок підтверджено достовірну сегментарну деміє­ліні­зацію, тобто локальне руйнування мієлінової оболонки із збере­жен­ням осьового циліндру під впливом броміду етидію. При цьому слід відзначи­ти своєрідну будову мієлінових оболонок з утворенням везикулярних струк­тур. Загибель клітин Шванна на тлі ознак порушення мік­ро­цир­куляції відбу­вається переважно, зважаючи на структурні зміни ядра й харак­терний перерозподіл хроматину, по типу апоптозу.

При дослідженні фрагментівтканини стовбурових відділів мозку вді­лян­ці входу волокон корінця трійчастого нерва, порівняно з контролем на­ми виявленозменшення кількості олігодендроцитів і виразні дистро­фіч­ні зміни останніх. Цитоплазма таких клітин характеризується наявністю міто­хондрій з різним ступенем деструкції крист: від часткової фраг­ментації до їх повної деструкції, що призводить до подальшої вакуолізації органели. Характерною патологічною зміною цитоплазми в частині клітин є наявність значної кількості пустотілих вакуолей різного походження (за рахунок вакуолізації мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) та комплексу Гольджі), що звичайно вказує на розпад і незворотні зміни структурних білків цитоплазми. Деякі олігодендрогліоцити беруть участь у фагоцитозі мієліну, останній розміщується у їх цитоплазмі у вигляді спіралеподібних або кільцеподібних утворень.

**Ремієлінізація корінця трійчастого нерва.** Було встановлено, що для дослідження ремієлінізації корінця трійчастого нерва морської свинки опти­мальним є використання 2,5% розчину прогестерону об’ємом 0,1 мл (2,5 мг прогестерону). Вивчення впливу розчину прогестерону на ремі­єлі­ні­зацію корінця трійчастого нерва проводилось шляхом хронічного екс­пе­ри­менту з використанням вищеописаної моделі локальної сегментарної де­міє­лінізації. На 14 добу після встановлення прокладки з 0,1% розчином бро­міду етидію тварини були прооперовані повторно. Важливим завдан­ням на цьому етапі дослідження була аплікація гормону саме на ділянку демієлінізації, а не на іншу ділянку нерва. Найкращим вирішенням цього завдання є ін’єкція розчину прогестерону в товщу тефлонового матеріалу, який був встановлений на першому етапі експерименту. Під час операції виявляли прокладку з волокнистого тефлону та ін’єкційно вводили у її товщу 2,5% розчин прогестерону об’ємом 0,1 мл (дослідна група) та нейтральну сезамову олію об’ємом 0,1 мл (контрольна група). Через 29 діб з моменту індукції демієлінізації (через 15 діб після аплікації про­гестерону або сезамової олії) тварини дослідної і контрольної груп були виведені з експерименту. Препарати корінців трійчастих нервів разом з прилеглими ділянками стовбура мозку та тріґемінального вузла досліджені за допомогою морфологічних та імуногістохімічних методик.

У ділянці впливу на 29 добу після початку експерименту без додат­кового впливу відзначено поновлення типової гістоархітектоніки корінця трійчастого нерва. Проте спостерігаються дистрофічно змінені аксони з вогнищевим порушенням цілості мієлінової оболонки, а також щільні мієлінові утворення, які у вигляді краплеподібних включень безладно розташовані в товщі нервового волокна. Визначаються великі осміофільні аксони з напливами нейроплазми, різко виражений інтерстиціальний та периваскулярний набряк, у частині судин спостерігаються пристінкові тромби. Відзначається збільшення діаметра осьових циліндрів, поряд із зменшенням діаметра мієлінової оболонки відносно норми. Нейроле­мо­ци­ти, в основному, проявляють ознаки морфофункціональної активності, про що свідчать поява в ядрі, заповненому еухроматином, одного вели­кого щільного ядерця. Окрім того, при специфічній імуногістохімічній реак­ції для визначення проліферативної активності (виявлення клітин в усіх фазах мітотичного поділу) нами виявлено нерівномірне й незначне збіль­шення кількості таких клітин. ІМ Кі-67 шванівських клітини складав 0,8-1,4±0,7%. В цитоплазмі спостерігається збільшення кількості фіксо­ваних та вільних рибосом, полісомних розеток, а також поява молодих форм мітохондрій. Проте, в нервових волокнах зберігаються ознаки деструктивних змін мієліну й виразні ознаки набряку пери- та ендоневрію. У тварин без додаткової корекції спостерігається нерівномірність набряку та утримання дистрофічних змін в тканині корінця. Поряд із ділянками, які містять численні клітини і судини, зустрічаються ділянки з невеликою кількістю клітин і капілярів, й пучками колагенових волокон. При імунофенотипуванні виявлена значна проліферативна активність клітин судинної стінки (з боку периневрального простору), проте судинний малюнок нерівномірний і визначаються безсудинні зони.

При дослідженні взірців нервової тканини після додаткового фар­мако­логічного впливу на корінець трійчастого нерву, нами встановлено, що гістоархітектоніка нервових волокон набуває фізіологічних спів­відно­шень або практично відновлена. Спостерігається значна гіперплазія клітин Шван­на, які оточують осьові циліндри, значне дифузне збільшення їх кількості із вірогідним зростанням їх проліферативного потенціалу. ІМ Кі-67 шва­нів­ських клітини складав 4,2-5,1±0,05%. В осьових циліндрах спо­сте­ріга­ється збільшення кількості мітохондрій з переважанням їх молодих форм. У периневральному просторі з’являється деяка кількість регенеро­ва­них безмієлінових волокон, включених по декілька в цитоплазму лемо­цита.

На напівтонких зрізах визначається відновлення типової структури нер­вового корінця з незначним розширенням ендоневрального простору і по­мірним повнокров’ям судин. Епіневрій стає дещо потовщеним, з чи­сель­ними дрібними судинами. Нами встановлена достовірна рівномірна проліферація в усіх шарах судинної стінки у цій серії досліду. Саме це свід­чить про функціонально повноцінне відновлення структури й забез­печення функції гематоневрального бар’єру, що доводить важливість цієї ланки нерва (його корінця) для можливості повноцінного відновлення та забезпечення функціонування. Стінки загальної маси мікросудин, розташованих в епіневрії, з ознаками функціонального відновлення.

У сполучній тканині спостерігається невелика кількість фібробластів та лаброцитів. У порівнянні з групою без додаткового впливу, суттєво збіль­шується кількість макрофагів, фібробластів. Більша частина фібро­блас­тів характеризується високою функційною активністю.

Порівняння найбільш характерних структурних змін корінця трій­частого нерва на 29 добу після застосування броміду етидію у різних до­слід­них групах наведено у таблиці 3.

Таким чином, аплікація прогестерону на попередньо демієлінізовану тканину корінця трійчастого нерва і стовбура мозку характеризується: змен­шенням ступеню демієлінізації, покращенням морфо-функціональ­но­го стану елементів корінця та мозку, зокрема, за рахунок зменшення на­бря­ку внаслідок нормалізації проникності ГЕБ та гемато-неврального бар’­єру та пристосувально-компенсаторних механізмів з боку клітинних еле­ментів (підвищення білоксинтезуючих функцій) і, як наслідок, актив­ною проліферацією клітин Шванна та клітин судинної стінки. Все це є свід­ченням посилення процесу ремієлінізації у вказаній ділянці корінця трій­частого нерва лабораторних тварин при місцевому застосуванні 2,5% роз­чину прогестерону.

Таблиця 3.

**Вплив аплікації прогестерону на структурні зміни корінців трійчастих нервів**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Якісні ознаки, різниця груп за критерієм Фішера-Ірвіна | Групи тварин | |
| Дослідна група  (з прогестероном) n=10 | Група порівняння  n=10 |
| Набряк периаксональний, р<0.02 | - | + |
| Набряк перивазальний, р<0.0001 | - | + |
| Набряк перицелюлярний, р<0.003 | - | + |
| Розширення ендоневральних прос­то­рів, р<0.0004 | - | + |
| Звитість ходу аксонів, р<0.002 | - | + |
| Наявність "хвилеподібних" структур, р<0.002 | - | + |
| Наявність "колосовидних" структур, р<0.02 | - | + |
| Кластери клітин Шванна, р<0.0001 | + | - |
| Вакуольна дистрофія мієлінових обо­лонок, р<0.003 | - | + |
| Наявність стромальних фагоцитуючих клітин, р<0.003 | - | + |

За допомогою морфометричного дослідження засвідчено: активацію синтезуючої функції ОДГ, стимуляцію проліферації клітин Шванна, призупинення процесів деструкції та залучення процесів репаративно-регенераторного характеру в ресинтез мієлінових оболонок корінця.

Для кількісного аналізу отриманих результатів ми визначали показник співвідношення площ осьового циліндра і мієлінового нервового волокна трійчастих нервів лабораторних тварин. Значення вказаного показника обернено пропорційне товщині мієлінової оболонки нервового волокна. Встановлено, що місцеве застосування прогестерону призводить до достовірного зниження цього показника (таб. 4 і діаграма 1).

Таблиця 4

**Показник співвідношення площі осьового циліндру**

**та мієлінового нервового волокна**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Умови досліду | Структура | Показник  співвідношення площі осьового циліндру і мієлінової оболонки,  M±m, n=30 |
| Контроль | стовбур | 0,37 ± 0,006 |
| корінець | 0,38 ± 0,007\* |
| Демієлінізація | стовбур | 0,62 ± 0,01\*, |
| корінець | 1,39 ± 0,07 |
| Реміелінізація  **без розчину прогестерону** | стовбур | 0,43 ± 0,007\*,\*\* |
| корінець | 0,54 ± 0,01\*,\*\* |
| Реміелінізація  **з розчином прогестерону** | стовбур | 0,37± 0,009\*\* |
| корінець | 0,37 ± 0,01\*\* |

\* достовірно порівняно з контролем

\*\* достовірно між групами дослідження

Діаграма 1.

**Порівняння показника співвідношення площі осьового циліндру**

**та мієлінового нервового волокна корінця трійчастого нерва**

**в різних групах дослідження**

Підсумовуючи вищенаведене, слід сказати, що аплікація 2,5% роз­чи­ну прогестерону на зону входу корінців трійчастого нерва морських сви­нок призводить до посилення процесу ремієлінізації у цій ділянці нерва.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і практичне розв’я­зан­ня актуального та маловивченого наукового завдання посилення реміє­лінізації корінця трійчастого нерва шляхом аплікації прогестерону в хро­нічному експерименті задля вдосконалення мікрохірургічного втручання при невралгії трійчастого нерва.

1. Розроблений нами мікрохірургічний доступ до корінця трійчастого нерва морської свинки дає змогу виконувати втручання зі встановленням волокнистих матеріалів поблизу зони входу трійчастого нерва у стовбур мозку без значимих для результатів експерименту пошкоджень оточуючої тканини мозку.
2. Застосування одного мікролітра 0,1% розчину броміду етидію відтворює локальну дегенерацію мієлінової оболонки корінця трійчастого нерву із збереженням цілісності аксонів у морської свинки. Використання 0,1% розчину вказаного гліотоксину спричиняє більш виражене сегментарне пошкодження мієлінової оболонки нерва в порівнянні з 0,05% розчином і, відповідно, більш прийнятне для відтворення процесу демієлінізації в зоні нейроваскулярного конфлікту.
3. Аплікація 0,1% розчину броміду етидію на корінець трійчастого нерва морської свинки викликає специфічну вакуольну дегенерацію мієлінової оболонки сегментарного характеру.
4. Розроблена експериментальна модель демієлінізації зони входу корінця трій­частого нерва з використанням оригінального доступу та розчину бро­мі­ду етидію придатна для досліджень процесів де- і ремієлінізації вка­за­них структур в умовах хронічного експерименту протягом тривалого часу.
5. Аплікація 0,1 мл 2,5% розчину прогестерону на попередньо демієлінізовану ділянку корінця трійчастого нерва морських свинок поблизу входу у стовбур мозку достовірно покращує відновлення мієлі­но­вої оболонки. Водночас вказана доза стероїдного гормону при місцевому застосуванні не викликає системного пошкодження тканин мозку.
6. Індекс мічення ІМ Кі-67(МІВ 1) в тканині дослідної групи достовірно збільшений у порівнянні з групою контролю: 4,2-5,1±0,05% проти 0,8-1,4±0,7% відповідно, що свідчить про підвищення проліферативної активності нейролеммоцитів, тобто активацію утворення мієлінової оболонки на фоні аплікації прогестерону.
7. Місцеве застосування прогестерону викликає достовірне зниження показника співвідношення площ осьового циліндра і мієлінового нер­во­во­го волокна. В дослідній групі цей показник становив 0,37 ± 0,01, а в групі порівняння (без впливу прогестерону) – 0,54 ± 0,01, що є наближеним до контрольного показника і свідчить про позитивний вплив місцевого застосування прогестерону на товщину мієлінової оболонки трійчастого нерва лабораторних тварин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

* + 1. Чомоляк Ю.Ю. Експериментальна модель локальної демієлінізації корін­ця трійчастого нерва // Науковий вісник Ужгородського універ­ситету. Серія „Медицина”. – 2007. – № 4(32). – С. 258-262
    2. Чомоляк Ю.Ю. Ремієлінізація зони входу трійчастого нерва під впли­вом аплікації прогестерону в експерименті // Український нейро­хірур­гіч­ний журнал. – 2007. – № 4. – С. 30-32
    3. Чомоляк Ю.Ю., Смоланка В.І. Сучасні погляди на патогенез невралгії трій­частого нерва // Український нейрохірургічний журнал. – 2005. – №2. – С. 78-80

Дисертант узагальнив сучасні дані про патогенез невралгії трійчастого нер­ва, висловив свої припущення щодо перспектив подальших дослі­джень ремієлінізації та взяв участь у підготовці статті до пуб­лі­ка­ції.

* + 1. Чомоляк Ю.Ю., Смоланка В.І. Невралгія трійчастого нерва: сучасний стан проблеми // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія „Медицина”. – 2005. – № 1(24). – С. 25-27

Дисертант виконав огляд літератури, брав участь у підготовці статті до публікації.

* + 1. Україна. Патент №25050 U, UA, МПК А61B 17/00, патентовласник – Ужгородський національний університет – З.№u200702595. Заявлено 12.03.2007; опубліковано 25.07.2007, б.№11/2007. Спосіб мікрохірур­гіч­­ного доступу до корінця трійчастого нерва експериментальних тварин
    2. Чомоляк Ю.Ю., Малишева Т.А., Шамаєв М.І., Смоланка В.І. Експери­мен­тальна модель локальної демієлінізації корінця трійчастого нерва // Нові технології в нейрохірургії: Матеріали конференції нейрохірургів України (26-28 квітня 2006 р.). Український нейрохірургічний журнал. – 2006. – № 2. – С. 102

Дисертант підготував мультимедійну презентацію та доповів резуль­тати своєї роботи на конференції нейрохірургів України.

АНОТАЦІЯ

Чомоляк Ю.Ю. Локальний вплив аплікації прогестерону на ремієлі­ні­за­цію зони входу трійчастого нерва в експерименті. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.05 – нейрохірургія. Державна установа "Інститут ней­рохірургії імені академіка А.П.Ромоданова АМН України", Київ, 2008 рік.

Дисертація присвячена проблемі ремієлінізації корінця трійчастого нерва при невралгії цього нерва. Вивчено можливість аплікації розчину прогестерону на корінець трійчастого нерва лабораторних тварин під час мікрохірургічного втручання та проаналізовано морфологічні зміни мієлінової оболонки при місцевому використанні цього гормону. Для проведення дослідження вдосконалено мікрохірургічний доступ до корін­ця трійчастого нерва морської свинки, використовуючи який, розроблено експериментальну модель сегментарної токсичної демієлінізації зони входу цього нерва. За допомогою морфологічних та гістохімічних методів встановлено, що аплікація 2,5% розчину прогестерону на демієлінізовану частину корінця трійчастого нерва під час мікрохірургічного втручання покращує відновлення мієлінової оболонки.

Ключові слова: невралгія трійчастого нерва, експериментальна фо­каль­на демієлінізація, прогестерон, ремієлінізація трійчастого нерва.

АННОТАЦИЯ

Чомоляк Ю.Ю. Локальное воздействие прогестерона на ремиели­низацию зоны входа тройничного нерва в эксперименте. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.05 – нейрохирургия. – Государственное учреж­дение "Институт нейрохирургии имени академика А.П.Ромоданова АМН Украины", Киев, 2008 год.

Диссертация посвящена проблеме ремиелинизации корешка тройнич­ного нерва при невралгии. Изучена возможность аппликации раствора проге­с­терона на корешок тройничного нерва лабораторных животных во вре­мя микрохирургического вмешательства и проанализированы мор­фоло­гические изменения миелиновой оболочки при местном исполь­зо­ва­нии этого гормона.

Для проведения эксперимента использовались половозрелые морские свинки весом 200-350 г, животные удерживались в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Общее количество животных – 52 особи с одинаковым количеством самок и самцов. Был разработан ори­ги­нальный способ локальной токсической демиелинизации зоны входа корешка тройничного нерва. Сравнено воздействие разных демиели­низи­рующих веществ на этот нерв. Усовершенствован микрохирургический доступ к корешку тройничного нерва лабораторных животных. Доступ производился через среднюю черепную ямку. После рассечения твердой мозговой оболочки теменно-затылочная доля головного мозга морской свинки смещалась с помощью микрошпателя медиально. Таким образом визуализировали тенториум и его вырезку. После рассечения последней производилась аспирация церебро-спинальной жидкости, что способ­ствовало ретракции мозга животного. Подлежащие корешок и ганглий тройничного нерва были легко доступны для манипуляций. После сопоставления указанных выше данных и возможностей анестезии была разработана экспериментальная модель локальной сегментарной демие­линизации корешка тройничного нерва с помощью 0,1% раствора бромида этидия. С помощью световой и електронной микроскопии установлено, что тип разрушения миелиновой оболочки корешка тройничного нерва пос­ле использования этой модели близок к демиелинизации, которая на­блю­дается в месте сосудисто-нервного конфликта при тригеминальной нев­ралгии. А именно, возникают "колосовидные" изменения миелиновой обо­лочки, свидетельствующие о сегментарном характере дегенерации миели­на. Характерным является сохранение осевых цилиндров и пере­хва­тов Ранвье. При этом использование 0,1% раствора глиотоксина бромида этидия не сопровождалось выраженными токсическими осложнениями у лабораторных животных, значимых для результатов эксперимента.

Проведена серия экспериментов с использованием указанной модели для изучения влияния аппликации прогестерона на ремиелинизацию зоны входа корешка тройничного нерва. Дизайн исследования предусматривал аппликацию 2,5% раствора женского полового гормона прогестерона на участок корешка тройничного нерва морской свинки, предварительно подвергнутый воздействию 0,1% раствора бромида этидия. Аппликация производилась на 14 сутки после использования глиотоксина; во время повторной операции в толщу тефлоновой прокладки, установленной вначале эксперимента, иньекционно вводился раствор прогестерона. На 15 сутки после аппликации лабораторные животные были выведены из эксперимента путем ингаляции токсических доз эфира. Ткань корешка тройничного нерва соответствующей стороны была исследована с помощью световой и электронной микроскопии, а также гистохимическими методами.

Установлено, что разработанный микрохирургический доступ к корешку тройничного нерва морской свинки дает возможность выполнять вмешательства вблизи входа этого нерва в ствол мозга без значительного риска повреждения окружающей ткани мозга. Использование одного микролитра 0,1% раствора бромида этидия воспроизводит локальную дегенерацию миелиновой оболочки корешка тройничного нерва с сохранением целосности аксонов морской свинки. Также установлено, что аппликация 0,1% раствора бромида этидия на корешок тройничного нерва морской свинки вызывает специфическую вакуольную дегенерацию миелиновой оболочки сегментарного характера. Разработанная экспери­ментальная модель демиелинизации зоны входа корешка тройничного нерва з использованием оригинального доступа и раствора бромида эти­дия удобна для исследований процессов демиелинизации и ремиели­низации указанных структур в условиях хронического эксперимента на протяжении длительного времени. Доказано, что аппликация 0,1 мл 2,5% раствора прогестерона на предварительно демиелинизированный участок корешка тройничного нерва морских свинок вблизи входа в ствол мозга достоверно улучшает восстановление миелиновой оболочки. Вместе с тем, указанная доза стероидного гормона при местном использовании не вызывает системного повреждения вещества мозга. Индекс Ки-67 (МИВ 1) в ткани исследуемой группы достоверно увеличен в сравнении с групой контроля, что свидетельствует об увеличении пролиферативной актив­но­с­ти нейролеммоцитов указанной группы в сравнении с контролем. Мест­ное использование прогестерона вызывает достоверное снижение пока­зателя соотношения площадей осевого циллиндра и миелинового нерв­но­го во­локна, что свидетельствует об утолщении миелиновой оболочки на фо­не местного использования прогестерона.

Таким образом, местное использование 2,5% раствора прогестерона не сопровождается значимыми для результатов эксперимента неже­латель­ными воздействиями на организм морской свинки. Также устано­влено, что применение во время микрохирургического вмешательства указанного раствора в виде аппликации на участок нерва с явлениями демиели­ни­за­ции достоверно приводит к улучшению ремиелинизации.

Ключевые слова: невралгия тройничного нерва, експериментальная фо­кальная демиелинизация, прогестерон, ремиелинизация тройничного нерва.

SUMMARY

Yu.Yu.Chomolyak. Experimental local influence of progesterone application on remyelination of trigeminal nerve root-entry zone. – Manuscript.

Thesis submitted for Candidate of Medical Science degree, speciality 14.01.05 – neurosurgery. – A.P.Romodanov Institute of Neurosurgery, Ukr. Acad. Med. Sci., Kyiv, 2008.

The thesis is devoted to the problem of trigeminal nerve root-entry zone remyelination in case of trigeminal neuralgia. Possibility of progesterone local application on trigeminal nerve root of the laboratory animals during microsurgical procedure has been studied and morphological changes of the nerve myelin sheath have been analyzed. The author has modified microsurgical access to guinea pig trigeminal nerve root in order to create experimental model of segmental toxic demyelination of the nerve. With the help of morphological and histochemical methods is stated, that application of the 2.5% solution of progesterone on demyelinated part of the trigeminal nerve root during microsurgical procedure increase regeneration of myelin sheath.

Key words: trigeminal neuralgia, experimental focal demyelination, progesterone, remyelination of trigeminal nerve.

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