

Цимбалюк В.І.^{1,2}, Петрів Т.І.², Медведєв В.В.¹, Цимбалюк Ю.В.², Кліменко П.П.^{3,4},
Васильєв Р.Г.^{3,4}, Татарчук М.М.²

¹Національний медичний університет імені акад. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

²ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ, Україна

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна

⁴Біотехнологічна лабораторія *ilaya.regeneration*, медична компанія *ilaya*®, м. Київ, Україна

Ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті

Резюме. Актуальність. Травми опорно-рухового апарату, навіть незначні, можуть супроводжуватися ушкодженням периферичних нервів і призводити до часткової чи повної втрати функції кінцівок. Кількість таких пацієнтів з кожним роком зростає у зв'язку зі збільшенням кількості техногенних травм і складних поєднаних ушкоджень опорно-рухового апарату. Бурхлива урбанізація призводить до зростання загального нейротравматизму в середньому на 2 % на рік. У структурі травм опорно-рухового апарату ушкодження периферичних нервів становлять від 1,5 до 6 %, із них 90 % — верхньої кінцівки. Під час військових дій цей показник становить 12 % і спостерігається у 2,8–5 % пацієнтів із політравмою.

Мета: дослідити ранні результати відновлення сідничного нерва щура з використанням тканинно-інженерного підходу після його повного перетину в експерименті. **Матеріали та методи.** Сформовано 4 експериментальні групи: група 1 — перетин сідничного нерва (невротомія) та негайна автонеїропластика ($n = 14$); група 2 — невротомія та негайна пластика колагеновою трубкою, заповненою фібриновим гелем ($n = 15$); група 3 — невротомія та негайна пластика колагеновою трубкою, заповненою фібриновим гелем з вмістом мультипотентних стовбурових клітин — похідних нервового гребеня ($n = 16$); група 4 — несправжньооперовані тварини ($n = 7$). На 30-ту добу половину тварин з кожної групи (1-ша — $n = 7$, 2-га — $n = 7$, 3-тя — $n = 7$, 4-та — $n = 3$) виводили з експерименту шляхом тракції за ростральний кінець та для світлооптичної мікроскопії гістологічний матеріал (сідничний нерв оперований різними видами тканинно-інженерних підходів, що вказані вище) фіксували протягом доби в 10% розчині нейтрального формаліну, промивали зразки, зневоднювали у серії спиртів, поміщали їх у парафін та отримували зрізи товщиною 5 мкм на мікромомі. Потім зрізи депарафінізували у ксилолі та імпрегнували азотнокислим сріблом згідно з методом Більшовського, що дозволяє візуалізувати структурні елементи периферичної нервової системи. **Результати.** Після перетину сідничного нерва і автонеїропластики в імплантованому у зону пошкодження тканинно-інженерному провіднику на 30-ту добу на тлі посиленого розростання волокнистої сполучної тканини спостерігалось формування коротких тяжів нервових волокон, а також упорядкування їх розміщення. Крім того, у регенераті формувалися тонкі перемички між ділянками тяжів нервових волокон, що призводило до утворення безперервного зв'язку між регенеруючими тяжами нервових волокон на різних рівнях зони пошкодження сідничного нерва. При застосуванні порожнистого колагенового провідника, заповненого фібриновим гелем для заміщення дефекту сідничного нерва, на 30-ту добу відмічалось формування незначної кількості тонких, хаотично розташованих нервових волокон і слабо виражене формування волокнистої сполучної тканини. При використанні тканинно-інженерного провідника в цей же часовий період відбувалося значне розростання нервових волокон, їх гіпертрофія і утворення розгалужень нервових волокон,

орієнтованих у різних напрямках. Також при застосуванні інженерного провідника відмічено більш слабе формування волокнистої сполучної тканини порівняно з першою і другою експериментальними групами. **Висновки.** В результаті проведеного дослідження встановлено, що найбільшу подібність до архітекtonіки сідничного нерва інтактних тварин має регенерат нервових волокон, що утворюється при застосуванні автонеуропластики. У цьому регенераті утворювалися ділянки нервових волокон, що за своєю архітекtonікою найбільш близько відповідали нервовим волокнам у нативному сідничному нерві. Крім того, у ділянці пошкодження формувалися тонкі відростки, що зв'язували ділянки регенеруючих нервових волокон на різних рівнях. При цьому спостерігалось посилене розростання волокнистої сполучної тканини. Найбільш виражено формування нервових волокон, а саме гіпертрофія нервових волокон і значне їх розгалуження з формуванням сітки, виявлено при застосуванні тканинно-інженерного провідника. При цьому в тканинно-інженерному провіднику на фоні гіпертрофії регенеруючих волокон відмічено слабе формування пухкої волокнистої сполучної тканини. Отже, для визначення переваг одного з двох тканинно-інженерних підходів, використаних для регенерації сідничного нерва, необхідно провести вивчення результату процесу регенерації в більш пізній часовій точці.

Ключові слова: сідничний нерв; тканинна інженерія; мультипотентні стовбурові клітини — похідні нервового гребеня

Вступ

Травми опорно-рухового апарату, навіть незначні, можуть супроводжуватися ушкодженням периферичних нервів (ПН) і призводити до часткової чи повної втрати функції кінцівок. Кількість таких пацієнтів з кожним роком зростає у зв'язку зі збільшенням кількості техногенних травм і складних поєднаних ушкоджень опорно-рухового апарату [1, 2]. Бурхлива урбанізація призводить до зростання загального нейротравматизму в середньому на 2 % на рік [3].

У структурі травм опорно-рухового апарату ушкодження периферичних нервів становлять від 1,5 до 6 %, із них 90 % — верхньої кінцівки [4]. Під час військових дій цей показник становить 12 % [5] і спостерігається у 2,8–5 % пацієнтів із політравмою [6].

Протягом останніх трьох десятиліть зроблено значний прорив у відновленні периферичних нервів, зокрема, завдяки впровадженню мікрохірургічної техніки, операційного мікроскопа, електростимуляційних методик, покращенню можливостей для реабілітації пацієнтів із травмами периферичних нервів [7]. Проте навіть адекватно виконане реконструктивне втручання з використанням новітніх досягнень діагностики та лікування в більшості випадків не забезпечують повноцінного відновлення функції кінцівки, і проблема відновлення втрачених функцій при ушкодженні периферичних нервів поки що далека від остаточного вирішення.

На сьогодні золотим стандартом відновлення периферичних нервів при їх великих дефектах є автонеуропластика, проте вона має низку недоліків. Для отримання автотрансплантата використовують в основному чутливі нерви, і найпоширенішим як донор є *n.suralis*. Використання чутливих нервів як автотрансплантатів для пластики дефектів рухових нервів спричиняє морфологічну невідповідність природного мікрооточення, діаметра аксонів, що затримує проліферацію шваннівських клітин та їх здатність мієлінізувати нервові волокна [8–10].

Крім цього, небажаними чинниками є додаткова операція (для забору трансплантата), функціональний дефіцит в автономній зоні нерва донора, утворення

двох зон нейрорафії, виникнення невром і рубців, що утруднює проростання аксонів [11].

Перспективною альтернативою автонеуропластики є нейроінженерний підхід, що передбачає використання біосумісних біодеградуємих матриксів, стовбурових клітин і трофічних факторів, які можуть прискорювати відновлення ПН, а також запобігати ретроградній дегенерації ПН та відповідних нейронів спинного мозку у відповідь на пошкодження на периферії [12].

Критерії ідеальних стовбурових клітин включають швидкий та малоінвазивний спосіб їх отримання, швидке нарощування у культурі *in vitro*, здатність до виживання, проліферації та інтеграції в тканини центральної та периферичної нервової систем (ПНС) реципієнта, здатність до стабільної трансфекції віральними векторами та експресії відповідних екзогенних генів [13, 14].

Одним із найперспективніших джерел стовбурових клітин є нервовий гребінь (НГ). Нервовий гребінь — це транзиторна ембріональна структура, яка утворюється під час змикання нервових валиків у нервову трубку (нейруляція). В подальшому клітини нервового гребеня мігрують в товщу тканини сомітів і дають початок клітинним елементам периферичної нервової системи та структурам ненейронального типу [15]. Наявність стовбурових клітин у нервовому гребені було встановлено відносно недавно [16, 17].

Власне термін «стовбурові клітини нервового гребеня» (СКНГ) вперше використали Stemple та Anderson, після того як виділили культуру клітин НГ шляхом флуоресцеїн-активованого сортиру тканин ембріона щура, використовуючи антитіла проти низькоафінного рецептора росту нерва p75 [18]. Наступне культивування цих клітин показало, що більшість із них стали нейронами та невелика кількість — незрілими шваннівськими клітинами. У популяції клітин наступного клона виявлялися клітини нейронального типу і неспецифічні ненейрональні клітини із здатністю давати генерацію мультипотентних субклонів. Згодом у такий самий спосіб авторам вдалося виділити СКНГ, що представляли постміграторну популяцію, із фетального сідничного нерва щура. Клітини постміграторної

культури СКНГ *in vitro* диференціювалися у нейрони, шваннівські клітини, міофібробласти. При трансплантації цієї культури без періоду культивування безпосередньо в курячі ембріони спостерігався ріст нейрональних і гліальних структур у різних відділах ПНС [19].

Стовбурові клітини нервового гребеня ростральної частини НГ дають початок більшості кістково-хрящових структур обличчя, нервовим гангліям та гладким м'язам судин голови, вагусної та сакральної частин — нейронам стінки кишечника, трункусної — структурам периферичної нервової системи, пігментним клітинам шкіри, ендокринним клітинам наднирників [19, 20].

Також на сьогодні відомо, що із стовбурових клітин нервового гребеня утворюються не тільки клітини гліального та нейронального типу, а й фібробласти ендоневрію, тобто утворення всіх елементів периферичного нерва залежить від мультилінійної диференціації одного типу клітин — похідних нервового гребеня [20].

Волосяний фолікул складається із концентрично розташованих циліндрів, що містять клітини, які продукують високоспеціалізовані протеїни, зокрема кератин, основний компонент волосся, і перебуває у постійному динамічному стані: фаза росту (анаген), перехідна фаза (катаген), фаза спокою (телоген). Такий активний життєвий цикл передбачає наявність стовбурових клітин [21, 22].

Бульбарний регіон волосяного фолікула — ніша для епідермальних і меланоцитарних стовбурових клітин. Також у волосяному фолікулі є популяція клітин, які є похідними нервового гребеня, що мають надзвичайно широкий потенціал до диференціювання й експресують нестин, маркер стовбурових клітин нейрального типу [18, 19, 22].

Група вчених під керівництвом Sieber-Blum відкрили їх у 2004 році і довели походження цих клітин із нервового гребеня [23].

На сьогодні доведено, що стовбурові клітини нервового гребеня, виділені із волосяного фолікула, можуть диференціюватися у нейрони, гліальні клітини, кератиноцити, гладком'язові клітини, меланоцити *in vitro* [17, 18, 20]. Фенотип та особливості культивування стовбурових клітин нервового гребеня доводять, що вони мають високий проліферативний потенціал, здатні до мультилінійного диференціювання, експресують антигени, характерні для мультипотентних стовбурових клітин (CD44, CD73, CD90 і Sca-1) і CD117 (маркер мігруючих клітин нервового гребеня). У культурі *in vitro* СКНГ демонструють здатність до клонального росту та самооновлення [21–23]. Виділені із волосяних фолікулів гризунів та людини стовбурові клітини нервового гребеня залежно від умов культивування перетворювалися у нейрони та S100-імунопозитивні гліоцити, що експресували β -3-тубулін та кислий гліальний протеїн фібрил (GFAP) [23].

Таким чином, мультипотентні стовбурові клітини похідні нервового гребеня разом із біосумісними полімерами є складовими перспективного тканинно-інженерного підходу до відновлення периферичних нервів.

Мета: дослідити ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину у експерименті.

Матеріали та методи

Дослідження виконано на 52 білих безпородних щурах-самцях (середня маса — 250 ± 25 г; 5–6 міс.), утримуваних у стандартних умовах віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» з дотриманням чинних норм біоетики (Директива Ради ЄС 86/609/ЄЕС «Про наближення законів, підзаконних та адміністративних положень держав-членів про захист тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (1986), Європейська Конвенція про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (1986), Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006)). Протокол дослідження схвалено Комітетом з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Сформовано 4 експериментальні групи: група 1 — перетин сідничного нерва (невротомія) та негайна автонеуропластика ($n = 14$); група 2 — невртомія та негайна пластика колагеновою трубкою, заповненою фібриновим гелем ($n = 15$); група 3 — невртомія та негайна пластика колагеновою трубкою, заповненою фібриновим гелем з вмістом мультипотентних стовбурових клітин — похідних нервового гребеня (МСК-ПНГ) ($n = 16$); група 4 — несправжньооперовані тварини ($n = 7$).

Мультипотентні стовбурові клітини — похідні нервового гребеня виділені методом експлантатів за Sieber-Blum et al. [14] з регіону bulge волосяного фолікула вібрис безпородних дорослих самців щурів ($n = 3$) віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», на базі ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Капсулу фолікула розрізали вздовж, фолікул пересікали поперечно вище та нижче від потовщення, яке виділяли з капсули та поміщали в чашку Петрі, вкриту колагеном. Після прикріплення протягом однієї години експлантати заливали середовищем росту: α MEM (Sigma, США) з додаванням 5% фетальної телячої сироватки (Sigma, США), 5 нг/мл основного фактора фібробластів (bFGF, Sigma, США), 10 нг/мл епідермального фактора росту (EGF, Sigma, США), 10 нг/мл інсуліноподібного фактора росту (IGF, Sigma, США), 1% поживної добавки ITS (Gibco, США), 2 мМ глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В. Культивування проводили в мультигазовому інкубаторі CB 210 (Binder, Німеччина) при температурі 37 °C у газовій суміші, що мала наступний склад: 90 % N_2 , 5 % O_2 і 5 % CO_2 . Перший пасаж проводили на 10-ту добу в культуральний флакон 25 см². Наступні пересіви клітин здійснювали при досягненні культурою субконфлуентного стану. Засівна кон-

центрація при пересівах становила 1000 клітин/см². Пасажування проводили за допомогою 0,05% розчину трипсину в 0,53 мМ розчині Na₂EDTA (Sigma, США). В експерименті використовували клітини 3-го пасажу.

Тканинно-інженерний провідник для пластики дефекту периферичного нерва засівали МСК-ПНГ за двохетапну технікою. На першому етапі проводили засів 200 тисяч МСК-ПНГ на внутрішню поверхню колагенового провідника NeuraGen® довжиною 1,0 см. Для цього закривали один кінець трубки, вносили суспензію клітин у живильному середовищі та закривали другий кінець. Для рівномірного розподілу клітин провідник розміщали у ролюерну установку CellNest Roller D2 (SINO-BIOTOP, Китай), яка знаходилась у мультигазовому інкубаторі, та культивували протягом 24 годин із швидкістю 20 обертів за 1 хвилину. На другому етапі на наступну добу засівали ще 800 тисяч МСК-ПНГ у порожнину провідника шляхом полімеризації фібринового гелю, що був виготовлений із крові щурів. Для виготовлення фібринового гелю від щурів збирали кров: 1) у центрифужні пробірки без антикоагулянту для виготовлення сироватки, що містить тромбін; 2) у центрифужні пробірки з антикоагулянтом АСD-А (Haemonetics, США) у співвідношенні 9 : 1 для отримання збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП). Кров без антикоагулянту інкубували у термостаті при 37 °С протягом години для її згортання. Потім центрифугували 20 хв при 4 °С та 2300 g, відбирали супернатант (сироватка, що містить тромбін) та заморожували при –80 °С до використання. Кров за антикоагулянтом обробляли центрифугуванням в два етапи: 1) 10 хв при 4 °С та 800 g (седиментація еритроцитів та мононуклеарів крові, отримання плазми крові); 2) 20 хв при 4 °С та 2300 g для седиментації тромбоцитів та отримання збагаченої тромбоцитами плазми. Потім ЗТП піддавалась двом циклам заморожування — відтаювання і центрифугування 20 хв при 4 °С та 2300 g. Супернатант (кріолізат ЗТП) відбирався та зберігався при –80 °С до використання. Для формування фібринового гелю клітини ресуспендували у 900 мкл кріолізату ЗТП, додавали 100 мкл сироватки з активованим тромбіном (суміш 750 мкл сироватки з тромбіном з 250 мкл 10% розчину СаСl₂) та заповнювали цим розчином порожнину закритого з одного боку колагенового провідника, закривали другий кінець провідника та інкубували 20 хв у мультигазовому інкубаторі при 37 °С до полімеризації фібринового гелю. Потім засіяний клітинами провідник розміщували у живильне середовище та культивували протягом 24 годин до використання.

Для оцінки життєздатності та адгезії клітин проводили комбіноване фарбування флуоресцеїн діацетатом (FDA, Sigma, США) і пропідіум йодидом (PI, Sigma, США). Для цього видаляли культуральне середовище, відмивали зразки три рази розчином Хенкса (Biowest, France) і заливали розчином Хенкса, що містив 1 мкг/мл FDA і 2 мкг/мл PI. Час інкубації становив для гранул 5 хвилин; 3D-гідрогелів і біфазних конструкцій — 10 хвилин. Після інкубації розчин барвників видаляли,

відмивали 3 рази розчином Хенкса. Після інкубації розчин барвників видаляли, відмивали 3 рази розчином Хенкса та досліджували за допомогою флуоресцентного інвертованого мікроскопа. FDA забарвлює живі клітини яскраво-зеленим кольором. PI проникає в мертві клітини і забарвлює ядро в червоний колір.

Для світлооптичної мікроскопії гістологічний матеріал фіксували протягом доби в 10% розчині нейтрального формаліну, промивали зразки, зневоднювали у серії спиртів, поміщали їх у парафін та отримували зрізи товщиною 5 мкм на мікромомі. Потім зрізи депарафінували у ксилолі та імпрегнували азотнокислим сріблом згідно з методом Більшовського, що дозволяє візуалізувати структурні елементи нервової системи.

Хірургічне втручання виконували за загального знеболювання тварини (внутрішньоочеревинне введення розчину ксилазину 15 мг/кг та кетаміну 70 мг/кг маси). З лінійного розрізу шкіри по латеральній поверхні стегна виділяли й мобілізували сідничний нерв на відстані 20 ± 1 мм від його виходу з порожнини малого таза, висікали фрагмент довжиною 10 ± 2 мм. У групі 1 фрагмент повертали на 180° і фіксували між куксами нерва 3–6 епіневральними швами за допомогою атравматичної голки із монофіламентною поліамідною ниткою 10/0. У групі 2 кінці нерва фіксували до трубчатого колагенового імплантанта, заповненого фібриновим гелем, за допомогою 4 епіневральних швів. У групі 3 кінці нерва аналогічним чином фіксували до трубчатого імплантата, заповненого фібриновим гелем з МСК-ПНГ у кількості 1 • 10⁶ клітин. У групі 4 перетин мобілізованого нерва не виконували. В усіх групах рану закривали пошаровими швами, профілактику інфекційно-запальних ускладнень здійснювали за допомогою введення розчинів біциліну-5 (1 млн ОД на 1 кг маси тіла) та дексаметазону (6 мг/кг маси). Після вказаних маніпуляцій тварини протягом 2–4 годин утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30 °С), у подальшому — у звичних умовах віварію.

Результати та обговорення

На поздовжніх зрізах нативні нервові волокна, що складають сідничний нерв, утворюють звивисті цілісні тяжі з прошарками пухкого волокнистого сполучнотканного матриксу (рис. 2А).

Після перетину сідничного нерва і наступної автонейропластики в імплантованому у зону пошкодження біоінженерному конструкті на 30-ту добу на тлі посиленого розростання волокнистої сполучної тканини спостерігалось формування коротких тяжів нервових волокон, а також упорядкування їх розміщення. Крім того, у регенерації формувалися тонкі перемички між ділянками тяжів нервових волокон, що призводило до утворення неперервного зв'язку між регенеруючими тяжами нервових волокон на різних рівнях зони пошкодження сідничного нерва (рис. 2Б).

При застосуванні тканинно-інженерного провідника із фібриновим гелем для заміщення дефекту сідничного нерва на 30-ту добу відмічалось формування

незначної кількості тонких, хаотично розташованих нервових волокон і слабо виражене формування волокнистої рихлої сполучної тканини (рис. 2В).

При використанні тканинно-інженерного провідника в цей же часовий період відбувалося значне розростання нервових волокон, їх гіпертрофія і утворення розгалужень нервових волокон, орієнтованих у різних напрямках. Також при застосуванні інженерного провідника відмічено більш слабе формування пухкої волокнистої сполучної тканини порівняно з першою і другою експериментальними групами (рис. 2Г).

Висновки

1. У результаті проведеного дослідження встановлено, що найбільшу подібність до архітекτονіки сідничного нерва інтактних тварин має регенерат нервових волокон, що утворюється при застосуванні автонеуропластики. У цьому регенераті утворювалися ділянки нервових волокон, які за своєю архітектоною найбільш близько відповідали нервовим волокнам у нативному сідничному нерві. Крім того, у ділянці пошкодження формувалися тонкі відростки, що зв'язували ділянки регенеруючих нервових волокон на різних рівнях. При цьому спостерігалось посилене розростання пухкої волокнистої сполучної тканини.

2. Однак найбільш виражено формування нервових волокон, а саме гіпертрофія нервових волокон і значне їх розгалуження з формуванням сітки, виявлено при застосуванні тканинно-інженерного провідника. При цьому в тканинно-інженерному провіднику на фоні гіпертрофії регенеруючих волокон відмічено слабе формування пухкої волокнистої сполучної тканини.

3. Отже, для визначення переваг одного з двох тканинно-інженерних підходів, використаних для регенерації сідничного нерва, необхідно провести вивчення результату процесу регенерації в більш пізній часовій точці.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

Інформація про вклад у роботу кожного автора: концепція і дизайн дослідження — В. Цимбалюк, Т. Петрів; моделювання травми, автонеуропластика, імплантація тканинно-інженерного провідника, забір тканинно-інженерного провідника для гістологічного дослідження — Т. Петрів; отримання та культивування МСК-ПНГ, створення тканинно-інженерних провідників — Р. Васильєв; проведення гістологічного дослідження — П. Кліменко; інтерпретація отриманих результатів — В. Цимбалюк, П. Кліменко, Т. Петрів, В. Медведєв, Р. Васильєв; написання тексту та редагування — В. Цимбалюк, Т. Петрів, П. Кліменко, В. Медведєв, Р. Васильєв.

Список літератури

1. Torres R. *Epidemiology of Traumatic Peripheral Nerve Injuries Evaluated by Electrodiagnostic Studies in a Tertiary Care Hospital Clinic* / Torres R., Miranda G. // *Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico*. — 2015. — Vol. 3, № 107. — P. 79-84.
2. Puzović V. *Etiology and mechanisms of ulnar and median forearm nerve injuries* / Puzović V., Samardžić M., Jovanović M., Živković B., Savić A., Rasulić L. // *Vojnosanitetski pregled*. — 2015. — Vol. 72, № 11. — P. 961-967.
3. Rasulić L. *The epidemiology of forearm nerve injuries — a retrospective study* / Rasulić L., Puzović V., Rotim K., Jovanović M., Samardžić M., Živković B., Savić A. // *Acta Clinica Croatica*. — 2015. — Vol. 54, № 1. — P. 19-24.
4. Ullah I. et al. *Transplantation of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells or Differentiated Neuronal Cells from Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Identically Enhances Regeneration of the Injured Peripheral Nerve* / Ullah I. et al. // *Stem Cells Development*. — 2017. — Vol. 26, № 17. — P. 1247-1257.
5. Guo J. *Promoting potential of adipose derived stem cells on peripheral nerve regeneration* / Guo J., Guo S., Wang Y., Yu Y. // *Molecular Medicine Report*. — 2017. — Vol. 16, № 5. — P. 7297-7304.

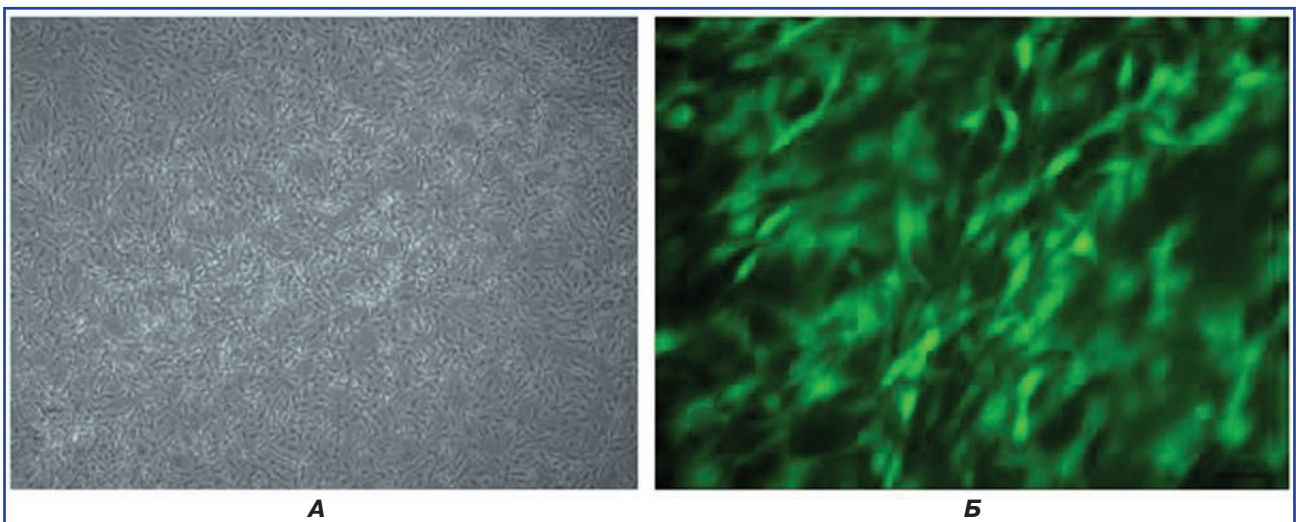


Рисунок 1. А — морфологія МСК-ПНГ в культурі. Фазово-контрастна мікроскопія, збільшення × 50; Б — оцінка життєздатності клітин в тканинно-інженерному провіднику. Забарвлення FDA/PI. 48 годин культивування, флуоресцентна мікроскопія, збільшення × 200

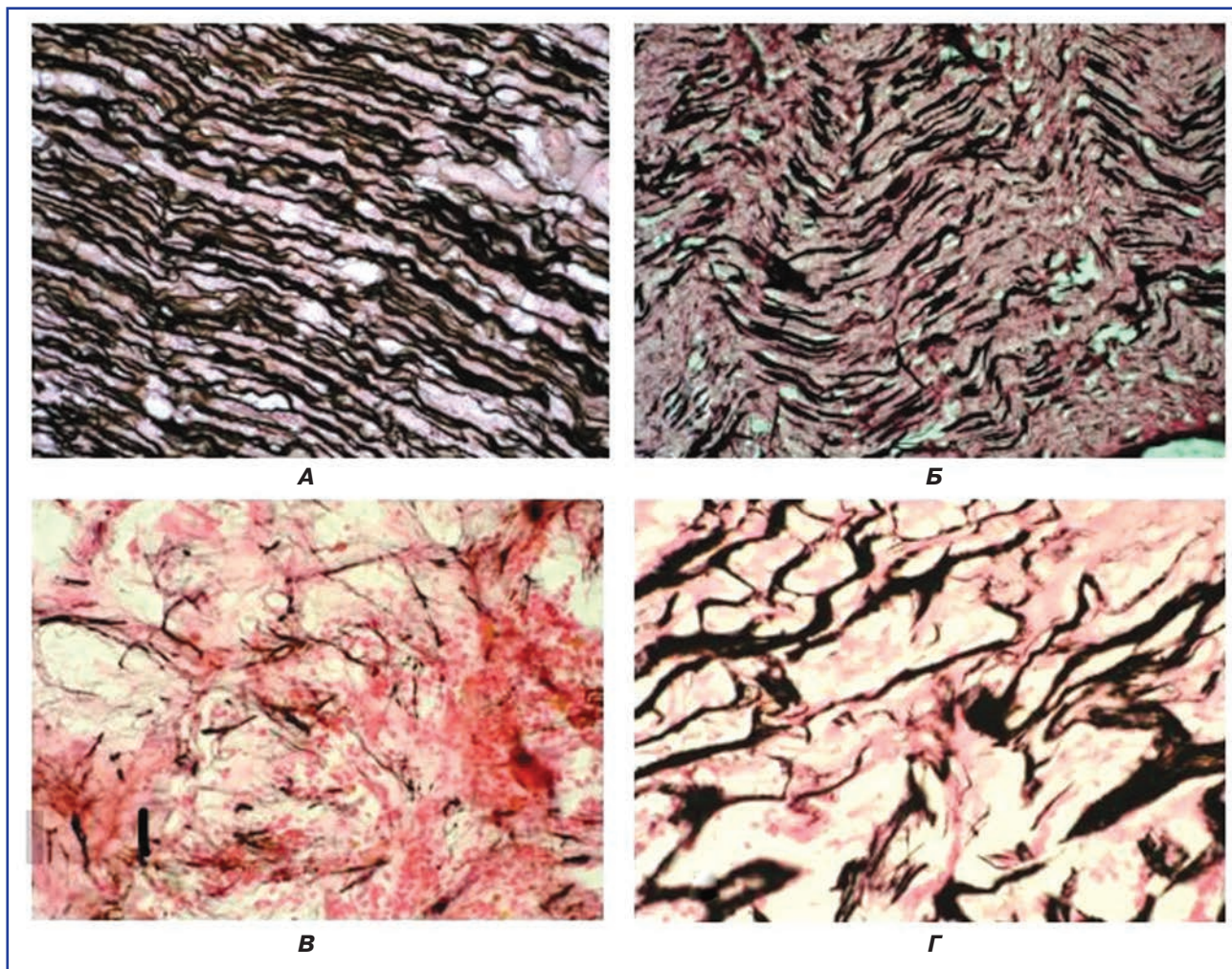


Рисунок 2. Гістологічне дослідження структури сідничного нерва. Забарвлення імпрегнацією азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 400$. А — контрольний інтактний нерв; Б — автонеуропластика; В — пластика сідничного нерва тканинно-інженерним провідником на основі колагену, фібринового гелю; Г — пластика сідничного нерва тканинно-інженерним провідником на основі колагену, фібринового гелю та МСК-ПНГ

6. Цимбалюк В.І. Електрофізіологічна діагностика закритого травматичного ураження плечового сплетення, поєданого з черепно-мозковою травмою / Цимбалюк В.І., Чеботарьова Л.Л., Дубина Г.І. // Український нейрохірургічний журнал. — 2004. — Vol. 4. — С. 65-68.

7. Sebben A.D. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. / Sebben Alessandra Deise, Martina Lichtenfels and Jefferson Luis Braga da Silva // Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition). — 2015. — Vol. 46, № 6. — P. 643-649.

8. Belanger K. Recent strategies in tissue engineering for guided peripheral nerve regeneration / Belanger Kayla // Macromolecular bioscience. — 2016. — Vol. 16, № 4. — P. 472-481.

9. Цимбалюк В.І. Дослідження ефективності комбінованої пластики сідничного нерва за його великого дефекту шляхом кількісної оцінки ступеня функціонального відновлення в експерименті у щурів / Цимбалюк В.І., Третьяк І.Б., Гацький О.О. // Український нейрохірургічний журнал. — 2012. — Vol. 3. — С. 48-51.

10. Whitlock E.L. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps / Whitlock E.L., Tuffaha S.H., Luciano J.P. // Muscle Nerve. — 2009. — Vol. 39, № 6. — P. 787-799.

11. Paczkowska E. Humoral activity of cord blood-derived stem/progenitor cells: implications for stem cell-based adjuvant therapy of neurodegenerative disorders / Paczkowska E. // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, № 12.

12. К вопросу об истории хирургических операций при ранениях периферических нервов / А.С. Золотов, О.И. Пак // Травматология и ортопедия России. — 2013. — № 3. — С. 162-166.

13. Ramburrin P. et al. A review of bioactive release from nerve conduits as a neurotherapeutic strategy for neuronal growth in peripheral nerve injury / Ramburrin P., Kumar P., Choonara Y.E., Vijukumar D., du Toit L.C., Pillay V. // BioMed Research International. — 2014. — 132350.

14. Гацький О.О. Комбінована пластика периферичних нервів при їх великих дефектах (експериментальне

дослідження): Автореф. дис... канд. мед. наук: 14.01.05 / О.О. Гацький; НАМН України, Ін-т нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова. — К., 2015. — 23 с.

15. Achilleos A., Paul A. Trainor. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy / Achilleos A., Paul A. Trainor // *Cell. Research*. — 2012. — Vol. 22, № 2. — P. 288-304.

16. Neil G. Fairbairn, Amanda M. Meppelink, Joanna Ng-Glazier, Mark A. Randolph, Jonathan M. Winograd. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion // *World J. Stem. Cells*. — 2015. — Vol. 7, № 1. — P. 11-26.

17. Mii S. et al. Nestin-Expressing Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Promote Whisker Sensory-Nerve Growth in Long-Term 3D-Gelfoam® Histoculture / Mii S., Duong J., Tome Y., Uchugonova A., Liu F., Amoh Y., Saito N., Katsuoka K., Hoffman R.M. // *Methods in Molecular Biology*. — 2016. — № 1453. — P. 39-47.

18. Hoffman R.M. Introduction to Hair-Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells / Hoffman R.M. // *Methods in Molecular Biology*. — 2016. — № 1453. — P. 1-5.

19. Hoffman Robert M. Nestin-expressing hair follicle-accessible pluripotent stem cells for nerve and spinal cord re-

pair / Hoffman Robert M. // *Cells Tissues Organs*. — 2014. — Vol. 200, № 1. — P. 42-47.

20. Vasylyev R.G. et al. Effects of Neural Crest-Derived Multipotent Stem Cells on Regeneration of an Injured Peripheral Nerve in Mice / R.G. Vasylyev, A.E. Rodnichenko, S.N. Shmallo, A.S. Demidchouk, I.F. Labunets, Yu.B. Chaikovskii, G.M. Butenko // *Neurophysiology*. — 2015. — Vol. 47, № 1. — P. 80-83.

21. Васильев Р.Г. Мультипотентные стволовые клетки из бульбарного региона волосяного фолликула со свойствами производных нервного гребня // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. — 2012. — Vol. 22, № 2. — С. 165-68.

22. Amoh Y. et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle-bulge stem cells can form neurons / Y. Amoh, L. Li, K. Katsuoka, S. Penman, R.M. Hoffman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. — 2005. — Vol. 102, № 15. — P. 5530-5534.

23. Sieber-Blum M. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle / Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y., Szeder V. // *Developmental Dynamics*. — 2004. — Vol. 231, № 2. — P. 258-269.

Отримано 30.01.2018 ■

Цымбалюк В.И.^{1,2}, Петрив Т.И.², Медведев В.В.¹, Цымбалюк Ю.В.², Клименко П.П.^{3,4}, Васильев Р.Г.^{3,4}, Татарчук М.М.²

¹Национальный медицинский университет имени акад. А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

²ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», г. Киев, Украина

³ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», г. Киев, Украина

⁴Биотехнологическая лаборатория *Ilaya.regeneration*, медицинская компания *Ilaya®*, г. Киев, Украина

Ранние результаты восстановления морфологической структуры седалищного нерва с использованием средств тканевой инженерии после его полного пересечения в эксперименте

Резюме. Актуальность. Травмы опорно-двигательного аппарата, даже незначительные, могут сопровождаться повреждением периферических нервов и приводить к частичной или полной потере функции конечностей. Количество таких пациентов с каждым годом растет в связи с увеличением количества техногенных травм и сложных сочетанных повреждений опорно-двигательного аппарата. Бурная урбанизация приводит к росту общего нейротравматизма в среднем на 2 % в год. В структуре травм опорно-двигательного аппарата повреждения периферических нервов составляют от 1,5 до 6 %, из них 90 % — верхней конечности. Во время военных действий этот показатель составляет 12 % и наблюдается у 2,8–5 % пациентов с политравмой. **Цель:** исследовать ранние результаты восстановления седалищного нерва крысы с использованием тканево-инженерного подхода после его полного пересечения в эксперименте. **Материалы и методы.** Сформированы 4 экспериментальные группы: группа 1 — пересечение седалищного нерва (невротомия) и немедленная аутонейропластика (n = 14); группа 2 — невротомиа и немедленная пластика коллагеновой трубкой, заполненной фибриновым гелем (n = 15); группа 3 — невротомиа и немедленная пластика коллагеновой трубкой, заполненной фибриновым гелем с содержанием мультипотентных стволовых клеток — производных нервного гребня (n = 16); группа 4 — ложноперерезанные животные (n = 7). На 30-е сутки половину животных из каждой группы (1-я — n = 7, 2-я —

n = 7, 3-я — n = 7, 4-я — n = 3) выводили из эксперимента путем тракции за клювовидный конец и для светооптической микроскопии гистологический материал (седалищный нерв оперирован различными видами тканево-инженерных подходов, указанными выше) фиксировали в течение суток в 10% растворе нейтрального формалина, промывали образцы, обезвоживали в серии спиртов, заключали их в парафин и получали срезы толщиной 5 мкм на микротоме. Затем срезы депарафинизировали в ксилоле и импрегнировали азотнокислым серебром по методу Бильшовского, что позволяет визуализировать структурные элементы периферической нервной системы. **Результаты.** После пересечения седалищного нерва и аутонейропластики в имплантированном в зону повреждения тканево-инженерном проводнике на 30-е сутки на фоне усиленного разрастания волокнистой соединительной ткани наблюдалось формирование коротких тяжей нервных волокон, а также упорядочение их размещения. Кроме того, в регенерате формировались тонкие перемишки между участками нервных волокон, что приводило к образованию непрерывной связи между регенерирующими тяжями нервных волокон на разных уровнях зоны повреждения седалищного нерва. При применении полого коллагенового проводника, заполненного фибриновым гелем для замещения дефекта седалищного нерва, на 30-е сутки отмечалось формирование незначительного количества тонких, хаотично расположенных нервных волокон и слабо

выраженное формирование волокнистой соединительной ткани. При использовании тканево-инженерного проводника в этот же временной период происходило значительное разрастание нервных волокон, их гипертрофия и образование разветвлений нервных волокон, ориентированных в разных направлениях. Также при применении инженерного проводника отмечено более слабое формирование волокнистой соединительной ткани по сравнению с первой и второй экспериментальными группами. **Выводы.** В результате проведенного исследования установлено, что наибольшее сходство с архитектоникой седалищного нерва интактных животных имеет регенерат нервных волокон, образующийся при применении аутонейропластики. В этом регенерате образовывались участки нервных волокон, которые по своей архитектонике наиболее близко соответствовали нервным волокнам в нативном седалищном нерве. Кроме того, в области повреждения формировались тонкие отростки, связы-

вающие участки регенерирующих нервных волокон на разных уровнях. При этом наблюдалось усиленное разрастание волокнистой соединительной ткани. Наиболее выражено формирование нервных волокон, а именно гипертрофия нервных волокон и значительное их разветвление с формированием сетки, выявлено при применении тканево-инженерного проводника. При этом в тканево-инженерном проводнике на фоне гипертрофии регенерирующих волокон отмечено слабое формирование волокнистой соединительной ткани. Следовательно, для определения преимуществ одного из двух тканево-инженерных подходов, использованных для регенерации седалищного нерва, необходимо провести изучение результата процесса регенерации в более поздней временной точке.

Ключевые слова: седалищный нерв; тканевая инженерия; мультипотентные стволовые клетки-производные нервного гребня

V.I. Tsybaliuk^{1,2}, T.I. Petriv¹, V.V. Medvedev¹, Yu.V. Tsybaliuk², P.P. Klymenko^{3,4}, R.G. Vasiliev^{3,4}, M.M. Tatarchuk²

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

²State Institution "Institute of Neurosurgery named after Academician A.P. Romodanov of the NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

³State Institution "Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

⁴Biotechnology Laboratory *ilaya.regeneration*, Medical Company *ilaya*®, Kyiv, Ukraine

Early results of sciatic nerve morphologic structure recovery using tissue engineering methods after its complete transection in experiment

Abstract. Background. Injuries of the musculoskeletal system, even insignificant, may be accompanied by damage to the peripheral nerves and lead to partial or complete loss of limb function. The number of such patients grows every year due to an increase in the number of industry-related injuries and complex combined injuries of the locomotor system. Urbanization leads to an increase in total nerve damage by an average of 2 % per year. In the structure of injuries of the musculoskeletal system, damage to the peripheral nerves is 1.5 to 6 %, of which 90 % are the upper extremity injuries. In military operations, this figure is 12 %, and is observed in 2.8–5 % of patients with polytrauma. The purpose of our study was to investigate the early results of sciatic nerve recovery in rat using tissue engineering methods after its complete intersection in the experiment. **Materials and methods.** Four experimental groups were formed: group 1 — transection of the sciatic nerve (neurotomy) and immediate autoneuroplasty (n = 14); group 2 — neurotomy and immediate plasty with collagen tube filled with fibrin gel (n = 15); group 3 — neurotomy and immediate plasty with collagen tube filled with fibrin gel containing multipotent neural crest derived stem cells (n = 16); group 4 — sham operated animals (n = 7). On day 30, a half of the animals from each group (7, 7 and 3 rats in groups 1, 2, 3 and 4, respectively) were excluded from the experiment by traction by the rostral end, and for optical microscopy, histopathologic sample (the sciatic nerve operated by various types of tissue-engineering approaches mentioned above) was fixed overnight in 10% neutral formalin solution, samples were washed, dehydrated in a series of alcohols, put in paraffin, and 5-µm sections on microtome were obtained. The sections were then deparaffinized in xylene and impregnated with nitrous oxide silver according to the Bilshovsky method, which allows visualization of the structural elements of the peripheral nervous system. **Results.** After the transection of the sciatic nerve and autoneuroplasty, in tissue-engineering conduit implanted in the damaged zone on day 30 against the background of increased growth of fibrous connective tissue, the formation of short

nerve fibers was noted, as well as the ordering of their placement. In addition, in the regenerate, thin junctions were formed between the sections of the nerve fibers, which led to the formation of a continuous connection between the regenerating strands of the nerve fibers at different levels of the sciatic nerve damage zone. When using hollow collagen conduit filled with fibrin gel to replace the defect of the sciatic nerve, the formation of a small number of thin, randomly located nerve fibers and a weakly expressed formation of fibrous connective tissue was observed on day 30. With the use of tissue-engineering conduit, in the same time period, there was a significant increase in nerve fibers, their hypertrophy and the formation of branches of nerve fibers oriented in different directions. Also, with the use of the tissue-engineered conduit, weaker fibrous connective tissue formation was noted compared with the first and second experimental groups. **Conclusions.** As a result of the study, it was found that a regenerate of nerve fibers, which is formed when using autoneuroplasty, has the greatest similarity to the architecture of the sciatic nerve of intact animals. In this regenerate, areas of nerve fibers were formed which, according to their architectonics, most closely corresponded to nerve fibers in the native sciatic nerve. In addition, in the area of damage, thin processes were formed that bind regions of regenerating nerve fibers at different levels. At the same time, there was an increased growth of fibrous connective tissue. The most pronounced formation of nerve fibers, namely, hypertrophy of nerve fibers and their significant branching with the formation of a mesh, was revealed when using tissue-engineering conduit. At that, in the tissue-engineering conduit, under the background of hypertrophy of regenerating fibers, weak formation of a fibrous connective tissue was noted. Therefore, to determine the benefits of one of two tissue-engineering approaches used to regenerate the sciatic nerve, it is necessary to study the result of the regeneration process at a later time point.

Keywords: sciatic nerve; tissue engineering; multipotent neural crest derived stem cells