

На правах рукописи

БОГОВ

Алексей Андреевич

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ
АУТОЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ НЕЙРОРЕГЕНЕРАЦИИ
В ХИРУРГИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЛЕЧЕВОГО СПЛЕТЕНИЯ

3.1.8. Травматология и ортопедия

3.1.10. Нейрохирургия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на базе Государственного автономного учреждения здравоохранения «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан».

Научные руководители:

доктор медицинских наук профессор **Ахтямов Ильдар Фуатович**
доктор медицинских наук профессор **Данилов Валерий Иванович**

Официальные оппоненты:

Меркулов Максим Владимирович – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, 3-е травматолого-ортопедическое отделение (микрохирургии и травмы кисти), врач-травматолог-ортопед;

Орлов Андрей Юрьевич – доктор медицинских наук, Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А.Л. Поленова – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, научно-исследовательская лаборатория нейрохирургии позвоночника и периферической нервной системы, заведующий.

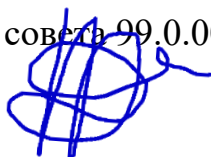
Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «___» _____ 2023 года в 13.00 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.0.008.02 в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Минздрава России (195427, Санкт-Петербург, ул. акад. Байкова, дом 8).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ ТО имени Р.Р. Вредена» Минздрава России и на сайте <http://dissovet.rniito.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.0.008.02
кандидат медицинских наук



Денисов А.О.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Повреждения плечевого сплетения (ППС) и его ветвей составляют от 60 до 81% от общего числа повреждений периферической нервной системы (Яриков А.В., 2019). ППС сопряжены с тяжелыми, порой необратимыми функциональными нарушениями, значительно ухудшающими качество жизни пациентов и часто приводящими к стойкой утрате трудоспособности (Горшков Р.П. и соавт., 2009; Rasulić L. et al., 2017). Наиболее частой причиной ППС являются дорожно-транспортные происшествия – 81% из общего числа повреждений, при этом в 46% случаев происходят отрывы верхнего ствола плечевого сплетения (ПС) и в 17% – полный отрыв стволов (Горбунов Н.С. и соавт., 2020). К другим причинам ППС относят производственные, бытовые, спортивные, криминальные травмы и повреждения, полученные в результате военных действий (Razaq S. et al., 2015).

Хирургическое лечение травматических ППС является одной из наиболее сложных реконструктивных операций в микрохирургической практике и требует технически сложных многоэтапных вмешательств (Menorca R.M et al., 2013). Точность восстановления анатомических структур нервных стволов во многом определяет функциональный исход операции и качество восстановления пациента после травмы (Baradaran A. et al., 2021). Стратегия оперативного вмешательства на плечевом сплетении (ПС) зависит от типа и вида травмы, локализации и степени ее тяжести, а также от срока давности травматического повреждения.

Существующие в клинической практике методы терапии поврежденных нервных стволов позволяют восстановить функцию после легкой травмы, однако, при тяжелых, застарелых или сочетанных травмах эти подходы малоэффективны (Карагяур М.Н. и соавт., 2017). Зачастую даже высокотехнологичная микрохирургическая техника не позволяет восстановить двигательную и/или чувствительную функцию поврежденной верхней конечности в полном объеме (Endo T. et al., 2019). Поэтому разработка методов

стимуляции регенерации для повышения эффективности хирургического лечения пациентов с ППС представляется весьма актуальной.

Степень разработанности темы исследования.

В современной профильной научной литературе описаны различные экспериментальные и клинические стратегии стимуляции регенерации поврежденных нервных стволов (Щаницын И.Н и соавт., 2017). Например, с целью улучшения восстановления моторных и сенсорных волокон с успехом применяют сочетание аутонейропластики с десимпатизирующими вмешательствами, что способствует нормализации кровотока в микроциркуляторном русле и термотопографии поврежденного сегмента конечности (Меркулов М.В. и соавт., 2015). В рамках реализации персонафицированной эффективной терапии постоянно ведется изучение способов стимуляции регенерации периферической нервной системы, основанных на использовании биоинженерных технологий и клеточной терапии (Faroni A. et al., 2015). Некоторые инновационные методы лечения в настоящее время все шире применяются в клинике, в то время как другие требуют дальнейшего изучения и клинической апробации.

По современным представлениям стимулятор регенерации должен обладать нейротрофическим и нейропротекторным действием, способствовать росту поврежденных аксонов, стимулировать ангиогенез в области повреждения и способствовать восстановлению утраченных функций. Заявленным требованиям в полной мере соответствуют стволовые клетки, успешно применяемые с целью усиления естественных процессов посттравматической регенерации и улучшения достижимых клинических результатов (Chato-Astrain J. et al., 2018; Tremp M. et al., 2018; Bucan V. et al., 2019). В частности, стволовые клетки, входящие в состав стромально-васкулярной фракции, выделенной из жировой ткани (СВФ-ЖТ), представляют собой мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, аналогичные стволовым клеткам, полученным из костного мозга, которые, как считается, обладают нейротрофическими свойствами.

Обладая широким спектром терапевтического применения, СВФ-ЖТ способны дифференцироваться в клетки, подобные Шванновским, что делает их наиболее перспективными для нейрорегенерации (Zavan B. et al., 2010; Norf A., et al., 2020). Они повсеместно распространены в жировой ткани и могут быть забраны в достаточном количестве при липосакции, выделены в кратчайшие сроки и введены в область травмы нерва с целью стимуляции посттравматической регенерации (De la Rosa M.B., 2018). Показано, что СВФ-ЖТ способны стимулировать регенерацию нервной ткани путем секреции биологически активных молекул (Trempe M. et al., 2018) и нейротрофических факторов (Araújo-Filho H. et al., 2016). Однако, несмотря на значимый терапевтический потенциал, в специально научной литературе практически отсутствуют данные о клиническом применении клеток СВФ-ЖТ с целью стимуляции посттравматической регенерации при ППС.

Для обоснования применения в клинической практике клеток СВФ-ЖТ, целесообразно проведение предварительного экспериментального доклинического исследования с использованием лабораторных животных в условиях, наиболее приближенных к клинике, позволяющих оценить регенераторный потенциал исследуемых клеток. При оценке терапевтических свойств в экспериментальных условиях сравнение эффективности целесообразно проводить с еще одним многообещающим подходом к решению проблем регенерации периферического нерва – генной терапией, способствующей выработке биологически активных молекул в клетках-мишенях реципиента (Ren Z. et al., 2015; Trempe M. et al., 2018). Наиболее изученными для этого представляются терапевтические гены, кодирующие фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов 2 (FGF2). Указанные факторы обладают одновременно ангиогенной и нейротрофической активностью и успешно применяются с целью стимулирования посттравматической нейрорегенерации (Dumppich M. and Theiss C., 2015; Muratori L. et al., 2018).

Продолжить изучение терапевтических свойств клеток СВФ-ЖТ целесообразно в клинических условиях в ходе различных реконструктивных

операций и, соответственно, при разных типах тракционных повреждений ПС, применяя подходы, позволяющие комплексно оценить эффективность проводимой терапии. Подобные комплексные исследования по этой теме на сегодняшний день отсутствуют, хотя их результаты могут раскрыть неисследованные ранее фундаментальные механизмы, послужить основой в решении проблем регенеративной медицины и улучшить результаты регенерации после травмы плечевого сплетения.

Цель исследования: оценить эффективность интраневральной трансплантации клеток стромально-васкулярной фракции выделенной из жировой ткани человека, для стимуляции посттравматической регенерации в хирургии плечевого сплетения.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние клеток стромально-васкулярной фракции выделенной из жировой ткани человека при интраневральной ксенотрансплантации в область аутонервной вставки седалищного нерва крысы.

2. В экспериментальных условиях провести сравнительную оценку эффективности посттравматической регенерации седалищного нерва крысы в условиях замещения дефекта нерва аутонервной вставкой и интраоперационной ксенотрансплантации клеток стромально-васкулярной фракции выделенной из жировой ткани человека и интраоперационной инъекции генно-терапевтической плазмиды pBUD-VEGF165-FGF2 коэкспрессирующей гены VEGF и FGF2.

3. Оценить эффективность посттравматического восстановления функции при тракционными повреждениями плечевого сплетения в условиях интраоперационной интраневральной аутооттрансплантации клеток стромально-васкулярной фракции, выделенных из жировой ткани при невролизе, нейрорафии и невротизации.

4. Разработать и апробировать устройство для дистракции реконструированных стволов плечевого сплетения при нейрорафии в сочетании с интраоперационной интраневральной аутотрансплантации клеток стромально-васкулярной фракции, выделенных из жировой ткани. Оценить возможность его применения для посттравматического восстановления двигательной и чувствительной функций верхней конечности в условиях клинической практики.

Научная новизна исследования.

1. Впервые в экспериментальных условиях показан терапевтический эффект ксенотрансплантации клеток СВФ-ЖТ сравнимый по эффективности с генной терапией плазмидой pBud-VEGF-FGF2 при введении в область аутонервной вставки седалищного нерва крысы. Показано, что клетки СВФ-ЖТ введенные интраневрально в область травмы седалищного нерва крысы поддерживают выживание чувствительных нейронов спинального ганглия L5 и стимулируют регенерацию аксонов.

2. В клинических условиях была проведена интраоперационная аутотрансплантация клеток СВФ-ЖТ для стимуляции регенерации при хирургическом лечении тракционных повреждений плечевого сплетения. Впервые было показано сокращение сроков посттравматического восстановления двигательной и чувствительной функции травмированной конечности пациентов при аутотрансплантации в область травмы плечевого сплетения клеток СВФ-ЖТ при реконструкции повреждений методами неврוליза, невротизации и нейрорафии.

3. В ходе работы было разработано устройство, позволяющее осуществлять нейрорафию стволов плечевого сплетения при диастазе, без натяжения с возможностью не инвазивной дистракции нерва в послеоперационном периоде. Показания сокращения сроков посттравматического восстановления стволов плечевого сплетения в условиях дозированной дистракции. Получен патент РФ на изобретение «Устройство для лечения поврежденных стволов плечевого сплетения» № 2772539 от 23.05.22.

Практическая значимость диссертационной работы.

1. В работе получены новые данные, обосновывающие целесообразность дальнейшего поиска клеточных типов, предназначенных для трансплантации с целью стимулирования регенерации периферических нервов.

2. Получены новые сведения об эффективности и безопасности применения клеток СВФ-ЖТ при реконструкции тракционных повреждений плечевого сплетения методами невролиза, нейрорафии и невротизации.

3. Проведенное исследование позволяет по-новому рассматривать СВФ-ЖТ в качестве стимулятора регенерации при травматическом повреждении плечевого сплетения.

4. Предложен оригинальный способ замещения дефекта нерва с помощью разработанного устройства, позволяющего осуществить нейрорафию при наличии диастаза между концами нерва с последующей дозированной его дистракцией, на которое получен патент РФ на изобретение № 2772539.

Методология и методы исследования. Проведенное диссертационное исследование включало три последовательные и взаимосвязанные части: экспериментальное исследование терапевтических свойств аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции, выделенной из жировой ткани (СВФ-ЖТ), с использованием лабораторных животных, клиническую апробацию в качестве стимулятора регенерации поврежденных стволов плечевого сплетения клеток СВФ-ЖТ пациентов, а также разработку и клиническую апробацию аппарата для дозированной дистракции стволов плечевого сплетения реконструированных после травматического повреждения.

Предварительно был проведен анализ научных публикаций по теме исследования. На первом этапе были проанализированы работы, подтверждающие высокий регенераторный потенциал и безопасность СВФ-ЖТ в разных областях регенеративной медицины. Вторым этапом было проведено экспериментальное исследование на седалищном нерве крысы с целью оценки терапевтических свойств ксенотрансплантированных в область аутонервной вставки СВФ-ЖТ. В ходе этого эксперимента оценивали нейропротекторные

свойства клеток в отношении чувствительных нейронов спинального ганглия L5 и стимулирующее влияние на рост аксонов в динамике посттравматического процесса путем оценки изменения максимальной амплитуды М-ответа икроножной мышцы крыс на протяжении 56 дней после аутонервной вставки седалищного нерва протяженностью 5 мм.

С целью всесторонней оценки нейрорегенераторного влияния клеточной терапии полученные результаты сравнивали с результатами посттравматической регенерации седалищного нерва крыс, реконструированных после травмы в тех же условиях, но при стимуляции регенерации с помощью генно-терапевтической плазмиды pBUD-VEGF165-FGF2, независимо экспрессирующей фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов 2 (FGF2). Эти факторы роста обладают одновременно ангиогенной и нейротрофической активностью и успешно применяются с целью стимулирования посттравматической нейрорегенерации в клинической практике (Muratori L. et al., 2018, Idrisova K.F. et al., 2022).

В результате проведенного экспериментального исследования были получены обнадеживающие результаты, сопоставимые по эффективности с генной терапией, что послужило основанием для разработки следующего этапа диссертационного исследования, оценивающего влияние СВФ-ЖТ на посттравматическую регенерацию стволов плечевого сплетения в клинических условиях. Для этого были проанализированы результаты лечения пациентов после закрытых тракционных повреждений плечевого сплетения, реконструированных в отделении Травматологии №2 (микрохирургии) ГАУЗ "РКБ" МЗ РТ в период с 2005 по 2010 годы. Ретроспективно по материалам медицинской документации пациентов с травматическим повреждением плечевого сплетения изучили случаи лечения без использования симуляторов регенерации нервной ткани. Всего было проанализировано 35 случаев классического хирургического лечения поврежденного плечевого сплетения, которые составили группу сравнения.

В период с 2013 по 2019 год проходил в основную группу пациентов было отобрано 32 случая. Этим пациентам были выполнены восстановительные

операции на поврежденных структурах плечевого сплетения (невролиз, невротизация или нейрорафия) с использованием клеток стромально-васкулярной фракции из жировой ткани пациента. Проспективная часть исследования включала сравнительный анализ исходов лечения пациентов с использованием клеток стромально-васкулярной фракции для стимуляции регенерации поврежденного плечевого сплетения с результатами аналогичных ретроспективных групп больных, в которых выполнялись классические микрохирургические реконструктивные операции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клетки стромально-васкулярной фракции, выделенные из жировой ткани человека, введенные в область повреждения крупного нервного ствола (седалищного нерва) крысы поддерживают выживание нейронов спинального ганглия L5 и стимулируют рост аксонов и не уступают по своей эффективности плазмиде pBud-VEGF-FGF2.

2. Аутологичные клетки стромально-васкулярной фракции, выделенные из жировой ткани пациента, введенные в область травмы нерва, реконструированного после тракционного повреждения плечевого сплетения, улучшают восстановление двигательной и чувствительной функции поврежденной конечности.

3. Применение разработанного устройства для distraction стволы плечевого сплетения после нейрорафии в условиях диастаза позволяет сократить сроки восстановления утраченных функций.

Степень достоверности результатов исследования. Выводы и рекомендации, представленные в диссертационной работе основаны на анализе профильных научных публикаций и результатах собственных экспериментов на животных и сравнительного клинического исследования. Экспериментальная часть диссертационного исследования была реализована на 45 белых лабораторных однополых крысах стандартизированного веса. На седалищном нерве животных был смоделирован диастаз протяженностью 5 мм, после чего

нерв был реконструирован через аутонервную пластику. Животные были разделены на 3 группы по 15 крыс в каждой, что позволило достоверно оценить результаты в исследуемых группах. Животным первых двух групп применяли стимуляторы нейрорегенерации, сопоставимые задачам. В клинической части работы были проанализированы функциональные исходы оперативного лечения пациентов с различными техниками оперативного лечения периферических нервов (невролиз, невротизация и нейрорафия) за разные периоды времени. Пациенты были разделены на две сопоставимо равные группы, по количеству пациентов и характеристикам травмы, но отличавшиеся по применяемой методике лечения. Группа сравнения включала 35 случаев классического хирургического лечения поврежденного плечевого сплетения. В основную группу исследования вошли 32 случая стимуляции посттравматической регенерации повреждённых структур плечевого сплетения с использованием клеток СВФ-ЖТ пациента на трех операционных моделях: невролиз, невротизация и нейрорафия по показаниям. Оценка функционального восстановления оценивали в динамике через 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев после операции. Полученные количественные данные были подвергнуты адекватной статистической обработке. С учетом вышеизложенного результаты выполненного диссертационного исследования представляются достоверными, а сделанные выводы – обоснованными.

Апробация и реализация результатов исследования.

По теме диссертационного исследования опубликованы 15 печатных работ, включая 3 статьи в журналах, входящих в перечень рекомендуемых ВАК для публикаций диссертантов, статьи в зарубежных журналах, тезисы в материалах профильных научных конференций, патенты РФ на изобретения «Способ замещения дефекта периферического нерва» №2499565 от 27.11.2013 и «Устройство для лечения поврежденных стволов плечевого сплетения» № 2772539 от 23.05.2022.

Материалы диссертационного исследования доложены на Поволжской с Российским участием мультидисциплинарной научно-практической

конференции «Современные методы диагностики и лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательного аппарата» (Казань, 2020); Ежегодной научно-практической конференции, посвященной актуальным вопросам травматологии и ортопедии детского возраста «Турнеровские чтения» (СПб, 2020); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики и лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательного аппарата» (Казань, 2019); VIII национальном конгрессе «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (М., 2019); IV Всероссийском конгрессе с международным участием «Медицинская помощь при травмах и неотложных состояниях в мирное и военное время. Новое в организации и технологиях» (СПб, 2019); Евразийском ортопедическом форуме (М., 2017); VI Евразийском конгрессе Травматологов-ортопедов (Казань, 2017); VI Всероссийском съезде общества кистевых хирургов, (Нижний Новгород, 2016); IV Национальном конгрессе «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (М., 2015).

Результаты диссертационного исследования внедрены в практику работы травматологических отделений ГАУЗ РКБ МЗ РТ, ГКБ №7 г. Казани, а также применяются в Казанском ГМУ при обучении ординаторов, аспирантов и травматологов-ортопедов, проходящих усовершенствование по программам дополнительного образования.

Личный вклад автора. Диссертант самостоятельно провел анализ профильной отечественной и зарубежной научной литературы, изучил и проанализировал истории болезней пациентов ретроспективной части исследования. Лично выполнил экспериментальные исследования на животных и участвовал в работе с клеточными культурами *in vitro*. Принимал непосредственное участие в лечении профильных пациентов, являясь их лечащим врачом, в частности, проводил хирургические вмешательства у пациентов проспективной части исследования, провел сбор первичных данных, их статистическую обработку, интерпретацию полученных результатов исследований. Принимал активное участие в подготовке публикаций и заявки

на изобретение по теме диссертации, а также выступал с научными докладами по результатам проведенных исследований. Предложил соответствующий алгоритм, сформулировал выводы и практические рекомендации, написал все главы диссертации и автореферат.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертационного исследования представлены на 164 страницах. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы по материалам и методам исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа содержит 11 таблиц и 30 рисунков. Список литературы включает 177 источников: из них 66 – отечественных и 111 – иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, освещены его научная новизна и практическая значимость, изложены положения, выносимые на защиту, представлены сведения об апробации и реализации работы, объеме и структуре диссертации.

В первой главе диссертационного исследования представлен обзор научных публикаций, посвященные современным представлениям о проблеме хирургического лечения плечевого сплетения, описаны причины и механизмы травматического повреждения, виды травм, способы диагностики и методы хирургического лечения. Особое внимание в первой главе уделено методам стимуляции регенерации нервных волокон. Подробно представлены данные о применении аутологичной стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФ-ЖТ) при травматических повреждениях периферических нервов. Показано, что СВФ-ЖТ способны стимулировать регенерацию нервной ткани путём секреции биологически активных молекул и нейротрофических факторов. Однако, несмотря на значимый терапевтический потенциал в литературе практически отсутствуют данные о клиническом применении клеток СВФ-ЖТ с целью стимуляции посттравматической регенерации при

повреждениях плечевого сплетения. В значительной части исследования современных авторов рассматривают вопросы комплексной стимуляции регенерации периферического нерва в условиях экспериментальных исследований, тогда как работ, в которых проводится экспериментально-клиническое обоснование применения стимуляторов регенерации периферического нерва на сегодняшний день в литературе единицы, что определило цель и задачи диссертационного исследования.

Во второй главе представлены материалы и методы работы, включавшие экспериментальную и клиническую части. Экспериментальные исследования проводили на базе ФГБОУВО «Казанский государственный медицинский университет». На модели травматического повреждения седалищного нерва крысы проводили реконструкцию методом аутонервной вставки протяженностью 5 мм. С целью стимуляции регенерации интраоперационно интраневрально осуществляли ксенотрансплантацию СВФ-ЖТ. Для сравнительной оценки терапевтических свойств СВФ-ЖТ проводили дополнительные исследования. Во второй части экспериментов исследовали влияние генно-терапевтической плазмиды pBUD-VEGF165-FGF2, независимо экспрессирующей фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов 2 (FGF2) на посттравматическую регенерацию седалищного нерва крыс, реконструированных после травмы в тех же условиях. В ходе эксперимента оценивали нейропротекторные свойства клеток в отношении чувствительных нейронов спинального ганглия L5 и стимулирующее влияние на рост аксонов в динамике посттравматического процесса, путем оценки изменения максимальной амплитуды М-ответа икроножной мышцы крыс на протяжении 56 дней после аутонервной вставки.

Первая клиническая часть исследования включала анализ функциональных исходов хирургического лечения 67-ми пациентов с повреждениями плечевого сплетения, из которых 32 были включены в основную группу и 35 пациентов составили группу сравнения. В основную группу исследования вошли пациенты, которым были выполнены

восстановительные операции на повреждённых нервных структурах плечевого сплетения с использованием СВФ-ЖТ. Все пациенты были прооперированы в отделении Травматологии №2 (микрохирургии) ГАУЗ "РКБ" МЗ РТ. Пациенты внутри групп были разделены на подгруппы по способу реконструкции стволов плечевого сплетения – невролиз или невротизация.

Оценку функциональных исходов оперативного лечения пациентов проводили во время регулярных контрольных осмотров в сроки до 0-6, 6-12 и 12-24 и 24-36 месяцев после операции. С целью оценки качества посттравматического восстановления пациентов основной и контрольной групп исследования проводили клинико-инструментальные методы исследования, которые включали оценку восстановления двигательной и чувствительной функции. Также, в послеоперационном периоде, для оценки терапевтических свойств СВФ-ЖТ, пациентам проводили электромиографическое исследование, отражающее динамику функционального восстановления с подсчетом КДЕ в процентном отношении к интактной конечности.

Вторая клиническая часть диссертационного исследования посвящена разработке и апробированию неинвазивного устройства для distraction стволов плечевого сплетения, позволяющего осуществить нейрорафию при наличии диастаза между концами нерва. В ходе работы был получен патент РФ на изобретение «Устройство для лечения поврежденных стволов плечевого сплетения» № 2772539 от 23.05.22. Реконструкция поврежденных стволов плечевого сплетения с последующей тракцией и использованием СВФ-ЖТ была применена у двух пациентов. В группу сравнения вошли три ретроспективно обследованных пациента, которым была проведена нейрорафия стволов плечевого сплетения с последующей тракцией без стимуляторов регенерации.

В третьей главе диссертации представлены результаты и обсуждение результатов экспериментального исследования. Сравнительное исследование амплитуды М-ответа через 3, 14, 28, 42, 56 суток после аутонервной вставки седалищного нерва позволила зафиксировать статистически значимо большую

амплитуду М-ответа у животных первой и второй групп уже на 3 сутки наблюдения по сравнению с контрольной группой. Статистически значимых отличий между первой и второй группами в результате сравнительного анализа выявлено не было (таблица 1).

Таблица 1. Максимальная амплитуда М-ответа (среднее \pm стандартное отклонение) икроножной мышцы животных после аутонервной вставки седалищного нерва разных сроках после травмы нерва и результаты сравнительного анализа.

Период	Группа			Сравнения		
	СВФ-ЖТ	pBUD-VEGF165-FGF2	Контроль	p ¹	p ²	p ³
До операции	5,51 \pm 0,51	5,50 \pm 0,71	5,49 \pm 0,66	0,9993	0,9976	0,9995
3 сутки	3,50 \pm 1,02	3,61 \pm 0,96	1,06 \pm 1,01	0,9220	<0,0001	<0,0001
14 сутки	2,86 \pm 0,58	3,06 \pm 0,59	1,24 \pm 0,57	0,7658	<0,0001	<0,0001
28 сутки	2,28 \pm 0,55	2,41 \pm 0,70	1,52 \pm 0,90	0,8942	0,0249	0,0066
42 сутки	2,72 \pm 0,84	2,79 \pm 0,59	1,84 \pm 0,69	0,9707	0,0072	0,0034
56 сутки	4,41 \pm 1,05	4,23 \pm 1,03	1,99 \pm 0,92	0,8102	<0,0001	

p¹ – сравнение группы СВФ-ЖТ против группы pBUD-VEGF165-FGF2; p² – сравнение группы СВФ-ЖТ против контроля; p³ – сравнение группы pBUD-VEGF165-FGF2 против контроля.

Микроскопический анализ срезов спинальных ганглиев L5 на стороне операции позволил оценить количество выживающих нейронов. Было показано, что в группах с использованием СВФ-ЖТ и плазмиды pBUD-VEGF165-FGF2, количество выживающих нейронов было больше на 28,1% (p = 0,0197) и 26,8% (p = 0,0447), соответственно, по сравнению с животными посттравматическое восстановление которых происходило без стимуляции его регенерации. При этом, между экспериментальными группами со стимуляцией регенерации достоверных отличий зафиксировано не было. Учитывая легкодоступность СВФ-ЖТ и выраженные терапевтические качества сопоставимые по результативности с прямой генной терапией, был сделан вывод о

целесообразности клинической апробации предлагаемой методики с целью улучшения результатов лечения травматических повреждений плечевого сплетения.

В четвертой главе представлены клинические результаты и обсуждение результатов хирургического лечения повреждений плечевого сплетения с применением клеток стромальной васкулярной фракции. Было показано, что КДЕ в группах с интраневральной аутотрансплантацией СВФ-ЖТ превышает показатели контрольных групп (рис 1 и 2).

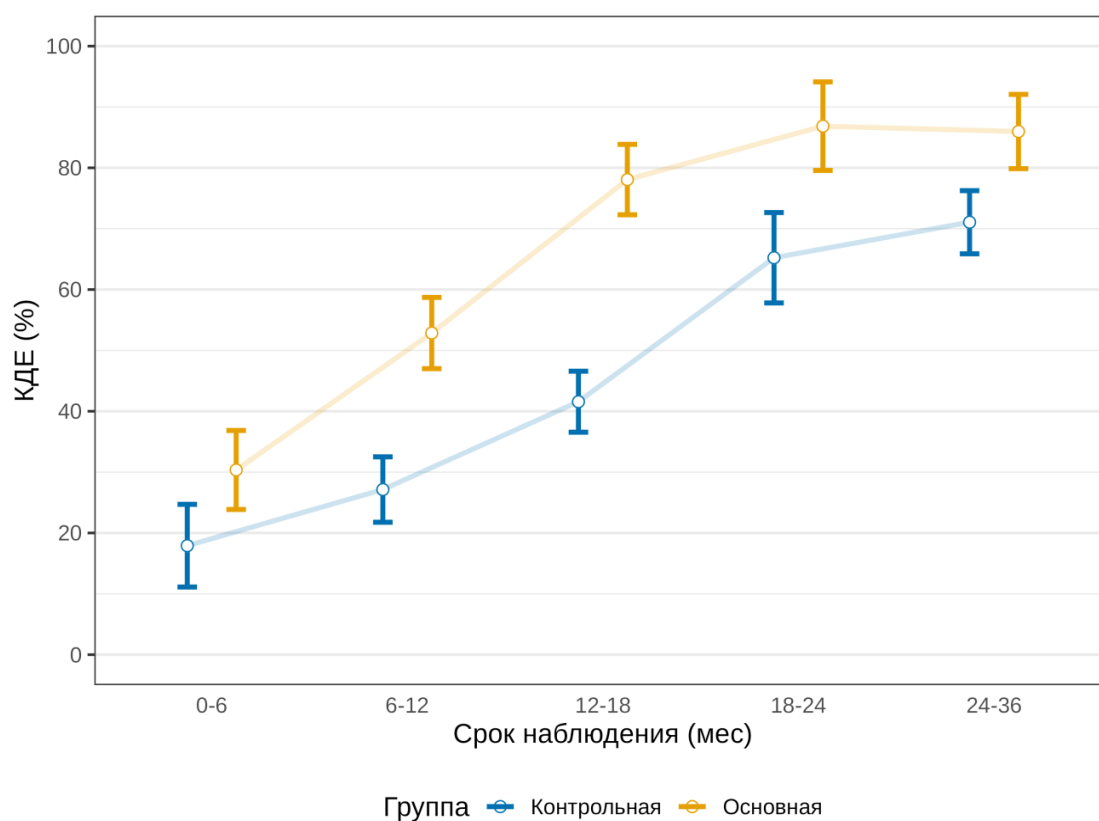


Рисунок 1. Результаты электромиографического исследования пациентов после неврулиза плечевого сплетения в контрольной и основной группах на разных сроках исследования. КДЕ – количество двигательных единиц. * - $p < 0,0001$.

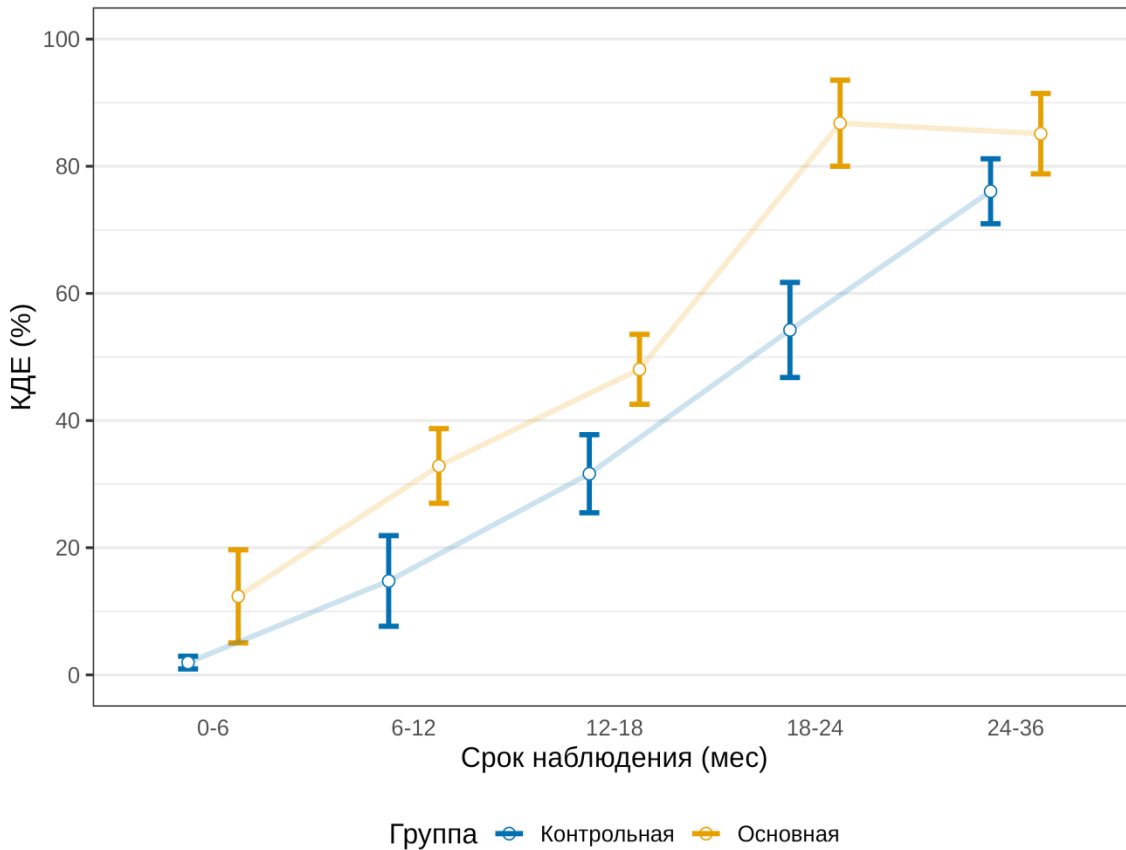


Рисунок 2. Результаты электромиографического исследования пациентов после невротизации плечевого сплетения в контрольной и основной (с введением СВФ-ЖТ) группах на разных сроках после операции

Показано, что у пациентов с клеточной стимуляцией наблюдаются более ранние сроки появления первых признаков реинервации с последующим ускорением процессов регенерации. Это способствует снижению ишемизации мышц после травмы, что является ключевым звеном, в достижении получения полезной функции в группе с применением СВФ-ЖТ на 30-35%.

Выполнение невротизации и эндоневротизации стволов плечевого сплетения с обширным фиброзным поражением со стимуляцией регенерации с аутотрансплантацией клеток СВФ-ЖТ позволила достичь полезное восстановление функции конечности у 18 пациентов из 20 - 90%, при этом «хорошие» и «отличные» результаты получены в 65%, «удовлетворительные» - у 25%, с опережением сроков восстановления на 4-6 месяцев по сравнению с группой контроля.

После выполнения различных вариантов невротизации с аутооттрансплантации клеток СВФ-ЖТ полезное восстановление функции М3-М5 получено на сроке 12-18 месяцев у всех пациентов. Наилучшие функциональные результаты были достигнуты после невротизации мышечно-кожного нерва межреберными с аутооттрансплантацией клеток СВФ-ЖТ -4 наблюдения и добавочным нервом через аутонервную вставку – 4 наблюдения. Во всех наблюдениях достигнуто восстановление функции двуглавой мышцы плеча до показателя М4 в 5 наблюдениях, М5 – в 3 наблюдениях. Показатели свидетельствует об эффективности использования клеточной терапии в хирургии повреждения плечевого сплетения.

Также в этой главе представлены результаты апробации разработанного в рамках диссертационного исследования аппарата для дозированной distraction нервов, позволяющего осуществить нейрорафию поврежденных структур плечевого сплетения при наличии диастаза. В ходе проведения электромиографического исследования на сроках 0-6 месяцев, 6-12 месяцев и 12-24 месяца после нейрорафии и установки аппарата для дозированной distraction стволов плечевого сплетения с применением клеток СВФ-ЖТ было зафиксировано значительное увеличение КДЕ. На сроке 9,5 месяцев случае было получено восстановление функции отведения плеча и сгибание предплечья в локтевом суставе, с функциональным результатом М5-S4.

Полученные данные дают нам основание заключить, что запатентованный хирургический подход можно рассматривать как возможную альтернативу аутонервной пластике нерва при диастазах между концами нерва до 5 см, а также метода не инвазивной стабилизации конечности на этапе осуществления дозированной тракции.

В пятой главе диссертации представлены обобщение и сопоставление экспериментальной и клинической частей диссертационной работы. Прежде всего представлено обоснование клинической апробации СВФ-ЖТ на основании полученных экспериментальных данных. Кроме того, представлены

подтверждения эффективности применения клеточной терапии при хирургическом лечении травматических повреждений плечевого сплетения.

В заключении подведены общие итоги диссертационного исследования, представлены сведения по решению поставленных задач диссертационной работы и кратко обсуждены полученные результаты.

ВЫВОДЫ

1. Клетки стромально-васкулярной фракции, выделенные из жировой ткани человека и введенные в область травмы седалищного нерва крысы, стимулируют регенерацию нерва и поддерживают выживание нейронов спинального ганглия L5.

2. Ксенотрансплантация клеток стромально-васкулярной фракции в область травматического повреждения седалищного нерва по своей эффективности не уступает эффектам генно-терапевтической плазмиды pBUD-VEGF165-FGF2, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и фактор роста фибробластов 2.

3. Аутооттрансплантация клеток стромально-васкулярной фракции в сочетании с хирургическими методами лечения в значительной степени повышает приживаемость аутоневрального трансплантата, стимулирует его реваскуляризацию, восстановление чувствительной и двигательной активности и тем самым значительно повышает эффективность операций при реконструкции плечевого сплетения.

4. Дозированная дистракция стволов плечевого сплетения с применением разработанного устройства позволяет проводить нейрорафию в сочетании с интраоперационной интраневральной аутооттрансплантацией клеток стромально-васкулярной фракции, выделенных из жировой ткани, при диастазе не более 5 см, тем самым сокращая сроки восстановления двигательной и чувствительной функции при выполнении оперативного пособия с наименьшей травматизацией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При планировании операции на плечевом сплетении, необходима тщательная предоперационная диагностика с целью выявления степени, уровня повреждения плечевого сплетения, а также окружающих его атомических структур.

2. С целью достижения наилучших функциональных результатов приступать к оперативному лечению пациентов изученного профиля следует в максимально ранние сроки с учетом отсутствия положительной динамики от консервативной терапии.

3. На основании экспериментальных исследований на животных, выполняя хирургическое лечение при повреждениях плечевого сплетения, целесообразно учитывать обоснованную нами модель применения клеток СВФ-ЖТ в клинической практике для стимуляции восстановления нарушенных функций.

4. При возможности прямой нейрорафии поврежденного плечевого сплетения может быть рекомендован оригинальный способ дозированной distraction стволы плечевого сплетения с применением разработанного устройства (патент РФ на изобретение № 2772539 от 23.05.22.), позволяющего сократить сроки восстановления двигательной и чувствительной функции.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Масгутов Р.Ф., Богов А.А. (мл.), Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Ханнанова И.Г., Галлямов А.Р., Богов А.А. / Стволовые клетки из жировой ткани - биологические свойства и перспективы клинического применения // Практическая медицина. - 2011. № 7 (55). С.18-20.

2. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А., Трофимова А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Исламов Р.Р., Чельшев Ю.А., Богов А.А., Ризванов А.А. / Стимуляция посттравматической регенерации седалищного

нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2011. Т.6. № 3. - С. 67-70.

3. Салафутдинов И.И., Масгутов Р.Ф., Богов А.А. (мл.), Ризванов А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Богов А.А. / Терапевтический потенциал клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при регенерации дефектов периферических нервов // Материалы IV Всероссийской научной конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». М.; 2011. С. 70-71.

4. **Масгутов Р.Ф., Ризванов А.А., Богов А.А. (мл.), Галлямов А.Р., Киясов А.П., Богов А.А. / Современные тенденции лечения повреждений периферических нервов // Практическая медицина. – 2013. Т2. № 1-2 (69). С. 99-103.**

5. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Салафутдинов И.И., Шульман А.А., Журавлева М.Н., Галлямов А.Р., Богов А.А. (мл.), Ризванов А.А. / Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы при ксенотрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани // Гены и Клетки. - 2015. Т.10. № 1. С. 98-102.

6. Богов А.А., Галлямов А.Р., Богов А.А. (мл.), Киясов А.П., Ахтямов И.Ф., Муллин Р.И., Ханнанова И.Г. / Применение клеток стромально-васкулярной фракции при хирургическом лечении больных с повреждением срединного и локтевого нервов верхней конечности // Материалы IV Национального конгресса «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» - 2015. С. 10-11.

7. **Богов А.А., Галлямов А.Р., Ханнанова И.Г., Масгутова Г.А., Муллин Р.И., Ахтямов И.Ф., Киясов А.П. / Клинико-экспериментальное обоснование применения клеток стромально-васкулярной фракции при травме периферических нервов // Практическая медицина. 2016. № 4-1 (96). С. 51-54.**

8. Ханнанова И.Г., Галлямов А.Р., Богов А.А., Журавлев М.Р., Богов А.А. / Первый опыт применения кондуита для замещения дефекта периферического нерва // Практическая медицина. - 2017. Т.8. №109. С.161-163.

9. Богов А.А. (мл.), Ханнанова И.Г., Богов А.А., Галлямов А.Р., Ризванов А.А., Ахятюм И.Ф. / Хирургическое лечение травмы плечевого сплетения с использованием клеток стромально-васкулярной фракции из жировой ткани // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики и лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательного аппарата» - 2019. С. 19-20

10. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Мухаметова Л.Р., Идрисова К.Ф., Муллахметова А.Ф., Сыромятникова В.Ю., Богов А.А. (мл.), Салафутдинов И.И., Архипова С.С., Салихов Р.З., Ризванов А.А. / Результаты сравнительной оценки эффективности применения плазмидной конструкции pBUD-VEGF165-FGF2 в моделях аутонервной пластики дефекта седалищного нерва и тубуляции коллагеновой трубкой NEURAGEN // Гены и Клетки. - 2020. Т.15. № 4. С.61-65.

11. Masgutov R., Zeinalova A., Masgutova G., Salafutdinov I., Garanina E., Syromiatnikova V., Idrisova K., Mullakhmetova A., Andreeva D., Mukhametova L., Rizvanov A., Bogov A., Kadyrov A., Pankov I. / Angiogenesis and nerve regeneration induced by local administration of plasmid pbud-coVEGF165-coFGF2 into the intact rat sciatic nerve // Neural Regeneration Research. - 2021. Т.16. [№ 9](#). С.1882-1889.

12. Богов А.А., Галлямов А.Р., Данилов В.И., Богов А.А., Масгутов Р.Ф., Ризванов А.А., Ахтямов И.Ф. / Сравнительный анализ применения клеток стромальной васкулярной фракции жировой ткани и генно-терапевтической плазмиды PBUD-VEGF165-FGF2 при экспериментальной аутонервной вставке седалищного нерва крысы // Политравма. - 2021. № 2. С. 103-108.

13. Idrisova K.F., Zeinalova A.K., Masgutova G.A., Bogov A.A., Allegrucci C., Syromiatnikova V.Y., Salafutdinov I.I., Garanina E.E., Andreeva D.I., Kadyrov A.A., Rizvanov A.A., Masgutov R.F. / Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury // Neural Regen Res. 2022. Vol. 17. № 6. Pp.1240-1247.

14. Патент на изобретение № 2499565 Способ замещения дефекта периферического нерва / Богов А.А., Масгутов Р.Ф., Ризванов А.А., Богов А.А., Галлямов А.Р. : - заявл. 07.06.2012, опубл. 27.11.2013, Бюл. № 33.

15. Патент на изобретение № 2772539 Устройство для лечения поврежденных стволов плечевого сплетения / Богов А.А., Ханнанова И.Г., Умаров Н.А., Бигбов И.Р., Богов А.А. : - заявл. 22.09.2021, опубл. 23.05.2022, Бюл. № 15.