



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милка Ф. Гардашевић

**Процена ефикасности примене плазме
обогаћене тромбоцитима у процесу
регенерације фацијалног нерва код
кунића**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Milka F. Gardašević

**Evaluation of the effectiveness of the
application of plasma enriched with
platelets in the process of facial nerve
regeneration in rabbits**

Doctoral Dissertation

Крагујевац, 2024

Аутор
Име и презиме: Милка Гардашевић
Датум и место рођења: 16.11.1968. Цетиње
Садашње запослење: специјалиста максилофацијалне хирургије, Клиника за максилофацијалну хирургију ВМА, Београд
Докторска дисертација
Наслов: Процена ефикасности примене плазме обogaћене тромбоцитима у процесу регенерације фацијалног нерва код кунџа
Број страница: 172
Број слика: 14 шема, 71 табела, 33 слике и 22 графикона
Број библиографских података: 91
Установа и место где је рад израђен: Институт за медицинска истраживања ВМА, Београд
Научна област (УДК): Стоматологија
Ментор: доц.др Александра Петковић-Ћурчин, виши научни сарадник, Институт за медицинска истраживања ВМА
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 13.12. 2022.
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватања теме докторске дисертације: IV-03-14/24; датум 15.03.2023.

Author
Name and surname: Milka Gardašević
Date and place of birth : 16.11.1968. Cetinje
Current employment: Maxillofacial surgery specialist, Clinic for Maxillofacial surgery, Military Medical Academy, Belgrade
Doctoral Dissertation
Title: Evaluation of the effectiveness of the application of plasma enriched with platelets in the process of facial nerve regeneration in rabbits
No.of pages: 172
No.of images: 14 diagrams, 71 tables, 33 figures and 22 graphas
No.of bibliographic data: 91
Institution and place of work: Institute for medical research, Military Medical Academy, Belgrade
Scientific area (UDK): Dentistry
Mentor: asist.prof Aleksandra Petković-Čurčin, Senior research associate, Institute for medical research, Military Medical Academy
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 13.12.2022.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic : IV-03-14/24 ; date 15.03.2023.

САЖЕТАК

Циљ: Циљ ове студије је био да испита ефекте аутологне плазме обогачене тромбоцитима на процес неурорегенерације повређеног фацијалног нерва.

Метод: Експерименталним животињама индуковали смо повреду фацијалног нерва секцијом. Испитиваној групи нанета хируршка повреда фацијалног нерва третирана је аутологном плазмом богатом тромбоцитима (PRP). Функција нерва је испитивана електрофизиолошким методама пре и након повреде (латенца, брзина нервне проводљивости и амплитуда), а степен временски зависног опоравка је процењен на основу патохистолошких параметара (број новостворених аксона, степен заступљености везивног ткива, неоваскуларизација, број Шванових ћелија). Методом субјективне визуализације покрета ушке утврдили смо време потребно за опоравак нерва, и одредили корелацију између брзине нервне проводљивости и броја новостворених аксона.

Резултати: Резултати добијени електрофизиолошким мерењима као и хистолошке анализе показали су најбоље резултате у групи III где смо користили PRP. У односу на друге групе које нису третиране PRP, утврђено је да постоји значајно скраћење временског интервала потребног за опоравак нерва. Компарацијом добијених резултата закључили смо да је брзина нервне проводљивости пропорционална броју новостворених аксона и упућује на успешну регенерацију и реинервацију по истеку шесте недеље од реконструкције повређеног фацијалног нерва. Предложена студија пружа податке о сврсисходности примене фактора раста у процесу нервне регенерације и потенцијалне клиничке примене чиме би се побољшала перспектива лечења повређеног фацијалног нерва.

Закључак: Примена аутологне плазме богате тромбоцитима значајно скраћује време неопходно за функционални опоравак фацијалног нерва и мимичне мускулатуре лица на моделу кунџа након индуковане хируршке повреде.

Кључне речи: плазма богата тромбоцитима, фацијални нерв, фактори раста, реконструкција, неурорегенерација, аксони, Шванове ћелије, електронеурографија, хистологија.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of autologous platelet-rich plasma on the neuroregeneration process of an injured facial nerve.

Material and Methods: In experimental animals, we induced facial nerve injury by dissection. A surgical injury to the facial nerve was treated with autologous platelet-rich plasma (PRP). Nerve function was examined by electrophysiological methods before and after injury (latency, nerve conduction velocity and amplitude), and the degree of time-dependent recovery was assessed based on pathohistological parameters (number of newly created axons, degree of connective tissue representation, neovascularization, the number of Schwann cells). Using the method of subjective visualization of ear movements, we determined that the time required for recovery is correlated with the speed of nerve conduction and the number of newly created axons.

Results: The results obtained by electrophysiological measurements as well as histological analyses showed the best results in group III where we used PRP. Compared to other groups that were not treated with PRP, it was found that there was a significant shortening of the time interval required for nerve recovery. By comparing the obtained results, we concluded that the speed of nerve conduction is proportional to the number of newly created axons and points to a successful regeneration and reinnervation after the end of the sixth week from the reconstruction of the injured facial nerve. The proposed study provides data on the expediency of the application of growth factors in the process of nerve regeneration and its potential clinical application, which would improve the perspective of the treatment of the injured facial nerve.

Conclusion: The administration of autologous platelet rich plasma significantly accelerates the functional recovery of the facial nerve and facial mimic muscles in a rabbit model after induced surgical injury.

Keywords: platelet rich plasma, facial nerve, growth factors, nerve regeneration, reconstruction, axons, Schwann cells, electromyoneurography, histology techniques.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. ИСТОРИЈСКИ ПРЕГЛЕД ДИСФУНКЦИЈА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА.....	2
1.2. АНАТОМИЈА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА.....	4
1.2.1. Микроанатомија-ултраструктура нервне ћелије.....	4
1.2.2. Једра фацијалног нерва.....	5
1.2.3. Функција фацијалног нерва.....	8
1.3. ТОПОГРАФСКА АНАТОМИЈА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА.....	11
1.3.1. Бочне и анастомотичне гране фацијалног нерва.....	14
1.3.2. Завршне гране фацијалног нерва.....	16
1.3.3. Васкуларизација фацијалног нерва	21
1.4. ЕМБРИОНАЛНИ РАЗВОЈ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА (општа разматрања).....	21
1.5. ПАТОЛОГИЈА ДИСФУНКЦИЈЕ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА	25
1.5.1. Идиопатска етиологија дисфункције фацијалног нерва.....	25
1.5.2. Трауматска етиологија дисфункције фацијалног нерва.....	25
1.5.3. Јатрогена оштећења фацијалног нерва.....	27
1.5.4. Инфективна етиологија дисфункције фацијалног нерва.....	29
1.5.5. Неопластична етиологија дисфункције фацијалног нерва.....	29
1.5.6. Конгенитални узроци парализе фацијалног нерва.....	29
1.5.6.1. Мобијусов синдром	29
1.5.6.2. Голденхаров синдром.....	30
1.5.6.3. Ди Џорџов синдром	30
1.5.6.4. CHARGE синдром	30
1.6. КЛАСИФИКАЦИЈА ПОВРЕДА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА.....	32
1.7. ПАТОФИЗИОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА НАКОН ПОВРЕДЕ.....	34
1.7.1. Валеријанова дегенерација	35
1.8. ХИРУРШКО ЛЕЧЕЊЕ ПОВРЕДА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА.....	38

1.9. БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛИ У РЕГЕНЕРАЦИЈИ ФАЦИЈАЛНО НЕРВА	41
1.9.1. Фактори раста - плазма обogaћена тромбоцитима.....	41
1.9.2. Матичне (стем) ћелије.....	45
1.9.3. Биоматеријали.....	45
1.9.4. Фибрински лепак.....	46
1.10. ПРОГНОЗА ОПОРАВКА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА	47
1.11. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТИЊСКИ МОДЕЛ- КУНИЋ.....	48
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗА ИСТРАЖИВАЊА.....	50
2.1. Циљеви	50
2.2. Хипотеза	50
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	51
3.1. ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ	51
3.2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ.....	51
3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН И ФОРМИРАЊЕ ГРУПА.....	52
3.4. ФАЗЕ СТУДИЈСКОГ ПРОТОКОЛА.....	53
3.4.1. Прва фаза.....	53
3.4.1.1. Анестезирање животиња.....	53
3.4.1.2. Електромионеурографија.....	53
3.4.2. Друга фаза	56
3.4.2.1. Припрема аутологне плазме обogaћене тромбоцитима.....	56
3.4.2.2. Хируршки индукована секција нерва	58
3.4.2.3. Реконструкција сецираног нерва	61
3.4.2.4. Визуализација покрета	65
3.4.3. Трећа фаза	66
3.4.3.1. Електромионеурографија	66
3.4.3.2. Хируршка процедура узимања узорка нерва	66
3.4.3.3. Хистолошка анализа	68
3.4.4. Жртвовање животиња	70

3.4.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА.....	70
4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....	71
4.1. БРОЈ ТРОМБОЦИТА.....	71
4.2. ЕЛЕКТРОДИЈАГНОСТИЧКЕ МЕТОДЕ	72
4.2.1. Одређивање латенце фацијалног нерва	73
4.2.1.1. Одређивање латенце пре секције нерва - подгрупа „А“.....	73
4.2.1.2. Одређивање латенце након реконструкције нерва - подгрупа „А“.....	75
4.2.1.3. Поређење вредности латенце по групама подгрупе „А“.....	76
4.2.1.4. Одређивање латенце пре секције нерва - подгрупа „Б“.....	78
4.2.1.5. Одређивање латенце након рконструкције нерва - подгрупа „Б“.....	80
4.2.1.6. Поређење вредности латенце по групама подгрупе „Б“.....	81
4.2.2. Одређивање брзине проводљивости фацијалног нерва	84
4.2.2.1. Одређивање брзине нервне проводљивости пре секције нерва подгрупа „А“ ..	85
4.2.2.2. Одређивање брзине нервне проводљивости пре секције нерва подгрупа „Б“ ..	88
4.2.2.3. Одређивање брзине нервне проводљивости подгрупа „А“ и “Б“ након секције нерва	91
4.2.2.4. Поређење брзине нервне проводљивости међу групама подгрупе „А“	94
4.2.2.5. Поређење брзине нервне проводљивости међу групама подгрупе „Б“.....	98
4.2.3. Одређивање амплитуде мишићног одговора	103
4.2.3.1. Одређивање амплитуде пре и након реконструкције нерва подгрупе „А“.....	103
4.2.3.2. Поређење вредности амплитуде пре и након реконструкције нерва по групама подгрупе „А“	106
4.2.3.3. Одређивање амплитуде пре и након реконструкције нерва подгрупе „Б“.....	108
4.2.3.4. Поређење вредности амплитуде пре и након реконструкције нерва по групама подгрупе „Б“.....	110
4.2.3.5. Процентуално одређивање вредности амплитуде подгрупа „А“ и „Б“	112
4.3. ПАТОХИСТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ	116
4.3.1. Одређивање броја аксона - подгрупе „А“ и „Б“.....	118
4.3.2. Одређивање степена заступљености везивног ткива - подгрупе „А“ и „Б“	124
4.3.3. Одређивање степена неоваскуларизације - подгрупе „А“ и „Б“	130
4.3.4. Одређивање броја Шванових ћелија - подгрупе „А“ и „Б“	134

4.4. КОРЕЛАЦИЈА БРОЈА АКСОНА И ШВАНОВИХ ЋЕЛИЈА	144
4.5. КОРЕЛАЦИЈА БРЗИНЕ НЕРВНЕ ПРОВОДЉИВОСТИ И БРОЈА АКСОНА	145
4.6. МЕТОДА СУБЈЕКТИВНЕ ВИЗУАЛИЗАЦИЈЕ ПОКРЕТА УШКЕ	147
 5. ДИСКУСИЈА	 149
 6. ЗАКЉУЧЦИ	 163
 7. ЛИТЕРАТУРА	 164

1. УВОД

Фацијални нерв (*nervus facialis*) је седми мешовити кранијални нерв који садржи моторна, сензорна и парасимпатичка влакна са значајно развијеним моторичким делом који инервише мимичну мускулатуру лица, платизму, стилохиоидни мишић, задњи трбух дигастричног мишића и мишић узенгије.

Парализа фацијалног нерва је заправо симптом, знак или последица неке друге болести или патолошког стања, а не болест у ужем смислу те речи. Фацијални нерв је одговоран за мимику нашег лица, омогућава његову покретљивост и тиме одражава наше расположење. Лице, део људског тела који је најизложенији погледима других, игра важну улогу у комуникацији са људима и околином.

Будући да је за експресију лица одговоран фацијални нерв, последице његовог обољења или његове дисфункције могу довести до тешких функционалних, естетских и психичких поремећаја (Слика 1.1). Управо због тога се одувек истраживала функција овог нерва и могућност његове регенерације након разних патолошких стања или повреда.



Слика 1.1 Парализа лица (из архиве Клинике за МФХ ВМА)

1.1. ИСТОРИЈСКИ ПРЕГЛЕД ДИСФУНКЦИЈЕ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Први писани документи који показују дисфункцију фацијалног нерва датирају још из периода пре нове ере. Хипократ је у 5. веку п. н. е. у књизи „Проретика II“ (*Proretica II*) написао „...изобличење лица, ако се не поклапа са било којим другим поремећајем тела, брзо пролази спонтано или услед лечења, у супротном доводи до трајне парализе лица“(1).

У 2. веку нове ере Гален (*Galen*) је хемифацијалну парализу повезану са лезијама мозга и изолованом парализом одређених делова лица описао као „грч усана, очију, чела, образа и корена језика“ (1).

Целије Аурелије (*Caelius Aurelianus*) је у 5. веку н. е. дао сликовит опис парализе изолованих делова лица, као и групе мишића захваћених спазмом.

Падом Римског царства изгубљен је велики део наслеђа античке Грчке и Рима. Са успоном ислама и арапским освајањем Персије (651. год. н. е.), појавило се интересовање за превођењем древних грчких и римских медицинских текстова који су углавном били дело Персијанаца и Јевреја (1).

Персијски лекар Мухамед ал-Рази (*Abu Bakr Muhammad ibn Zakariya Razi*, 865-925) је у 10. веку био први који је описао парализу фацијалног нерва у својој књизи „ал-Хави“ (*al-Hawi*) у поглављу под називом „Поремећај функције лица, грч и парализа“ где је детаљно приказао разлику између грча и парализе, као и билатералне парализе лица: „Видео сам човека са изобличеним лицем, једно око једва је могао да затвори, друго никако, када је пио воду, иста му је текла из уста“, на основу тога закључио је да су обе стране лица биле захваћене болешћу (1).

Рази (*Rasi*) је направио разлику између периферне и централне парализе лица на основу клиничких симптома болести. Разијев опис изоловане парализе лица је великим делом заснован на темељима Галенових описа, захваљујући којима је проширио своја медицинска истраживања (1).

Када је реч о хируршком лечењу повређеног фацијалног нерва, историја је релативно кратка.

Најсвеобухватнији клинички приказ фацијалне парализе пружио је шкотски анатом и хирург Чарлс Бел (*Sir Charles Bell*, 1774-1862) који је 1827. године описао акутну идиопатску једнострану парализу фацијалног нерва, која се у литератури и данас описује као Белова парализа. Бел је 1821. године дао прве смернице за хируршко збрињавање повређеног фацијалног нерва када је установио да поменути нерв инервише мимичне мишиће лица (2).

Дробник (*Drobnick*) је 1879. године први урадио анастомозу повређеног фацијалног нерва (*n. facialis*) са акцесорним нервом (*n. accessorius*) у циљу реконструкције парализованог лица.

Баланс и Манас (*Balance i Manasse*) су 1900. године објавили резултате реконструкције повређеног фацијалног нерва анастомозама са другим кранијалним нервима (*n. hypoglossus*, *n. glossopharyngeus* и *n. accessorius*) на експерименталном нивоу (2).

Бунел (*Bunnell*) је 1927. године урадио “*end to end*” сутуру фацијалног нерва у каналу темпоралне кости, а 1937. је први пут употребио нервни трансплантат након радикалне паротидектомије.

Чарлс Баланс (*Sir Charles Balans*), оснивач и први председник Друштва британских неурохирурга је 1931. године успешно применио слободни нервни трансплантат у реконструкцији великог дефекта интраемпоралног дела фацијалног нерва (2).

Историја трансплантације нерава у реконструкцији фацијалиса почиње 1870. године радовима Филипеа и Вуппијана (*Philipeauxa i Vulpiana*) (2).

Следећи корак у развоју хируршке корекције парализе лица је употреба васкуларизованих режњева, које је увео Клер Стрејнџ (*Clair Strange*) 1946. године (2).

Нова ера доноси нове изазове у лечењу парализе лица. Скарамела и Смит (*Scaramella i Smith*) су 1971. године први пут применили методу “*cross face*”, која подразумева обезбеђивање услова за раст здравих нервних аксона на крајцима парализованог нерва кроз нервни графт. Исте године, на основу претходних експерименталних студија, Томпсон (*Thompson*) користи трансплантат мишића у циљу реконструкције повређеног фацијалног нерва (2).

Репарација повређеног фацијалног нерва апликацијом фактора раста и матичних ћелија на месту повреде у комбинацији са биоматеријалима у последње две деценије доживела је праву експанзију. Ове методе су још увек на нивоу експерименталног истраживања са ограниченом клиничком применом (3).

1.2. АНАТОМИЈА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Фацијални нерв (*n. facialis*) и такозвани посредни нерв (*n. intermedius* - Wrisbergov нерв, глосопалатинални нерв, VII-bis) се најчешће описују заједно ("*intermediofacijalni nerv*"), мада имају различито ембрионално порекло (*n. facialis* јесте, а *n.intermedius* није брахијалног порекла) (2).

Фацијални нерв (*n. facialis*, VII пар кранијалних/можданих нерава, VII CN) је мешовити нерв са еферентним-моторним и вегетативно-парасимпатичким) и аферентним (сензитивним и сензорним) нервним влакнима. Излази из можданог стабла на граници моста (*pons*) и продужене мождине (*medulla oblongata - angulus pontocerebelaris*). Главна функција овог нерва је инервација мимичних мишића лица и проводљивост чула укуса из предње две трећине језика и усне дупље. Поред тога, обезбеђује и преганглиска парасимпатичка влакна до неколико ганглиона главе и врата (4 -7).

1.2.1. Микроанатомија-ултраструктура нервне ћелије

Неурони фацијалног нерва смештени у једрима можданог стабла или периферним ганглионима су различите величине (7-120μ), великог, округлог еухроматичног једра са једним или више нуклеолуса. У цитоплазми је изражен ендоплазматични ретикулум, а рибозоми су груписани у гроздасте формације слободне у цитоплазми или причвршћени за ретикулум које се при светлосној микроскопији описују као хроматинска телашца (*Nisslove* грануле) (2).

Нервно влакно (аксон) је смештено је у инвагинацијама мембране Шванових (*Schwann*) ћелија које аксону достављају метаболите и трофичке материје, формирано је од цитоплазме (аксоплазма) и мембране (аксолема). Аксони делују митогено на Шванове ћелије и подстичу диференцијацију ка мијелизованом и немијелизованом стању. Мијелински омотач настаје спиралним омотавањем продужетака Шванове ћелије око аксона (око 300 навоја), сам мијелин по саставу подсећа на плазма мембрану (2).

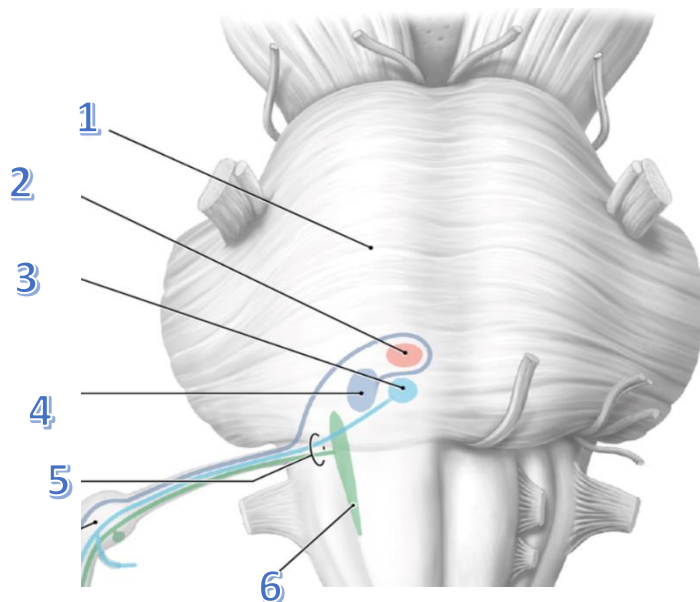
Од липида су најзаступљенији холестерол, гликолипиди и фосфолипиди (*galaktocerebrozid, sulfatid, gangliozid, holinglicerofosfatid, sfingomijelin*), а од протеина доминирају два базна протеина (P1 и P2) и један гликопротеин (P0). Мијелин садржи мало ензима, а само је један (3 *ciklični AMP 3-fosfohidrolaza*) детаљније испитан и служи у експерименталним студијама као маркер. У густим наслагама мијелинских ламела постоје правилни коси дисконтинуитети (*Schmidt-Lantermanove* инцизуре) који представљају метаболичке кондукционе канале ка дубини мијелинског омотача у аксону (2).

На споју суседних Шванових ћелија налазе се Ренвијева (*Renvier*) суужења (*nodus*), са дефектом мијелина, суужењем аксона и експонираном аксолемом. Интернодални простор износи 150-1500 микрона (2). У аксоплазми је немогућа протеосинтеза па се протеини преносе дуж аксона брзим или спорим аксонским транспортом.

Спори транспорт (1-3 *mm* дневно) се обавља кретањем аксоплазме, а брзи (400 *mm* дневно) преко микротубула након везивања за транспортне протеине: *kinezin* (транспорт од тела ћелије ка аксону) и *dinein* (за транспорт у супротном смеру) (2).

1.2.2. Једра фацијалног нерва

Влакна фацијалног нерва и интермедиуса почињу или завршавају у једном од четири једра у можданом стаблу: моторно једро - *nc.nervi facialis* и три висцерална једра - *nc. salivatorius superior*, *nc.lacrimalis* и *nc.solitarius* Ова једра, као и сва мождана нервна једра, имају своју прецизну топографску локализацију у оквиру шест функционалних серија једара у можданом стаблу. Главно, моторно једро фацијалног нерва (*nc. n. facialis s. nc. motorius n. facialis*) и његово парасимпатичко једро (*nc. salivatorius superior*) лоцирани су у мосту (*pons*) док се висцерално сензитивно једро (*nc. tractus solitarii s. nc. solitarius*) налази у продуженој мождини (4-8) (Шема 1.1).



Шема 1.1 Једра фацијалног нерва

1. *pons* 2. *nc. n. abduccens* 3. *nc. salivatorius superior* 4. *motorno jedro n. facialis*
5. *n. intermedius* 6. *nc. tractus solitarii (pars superior)*

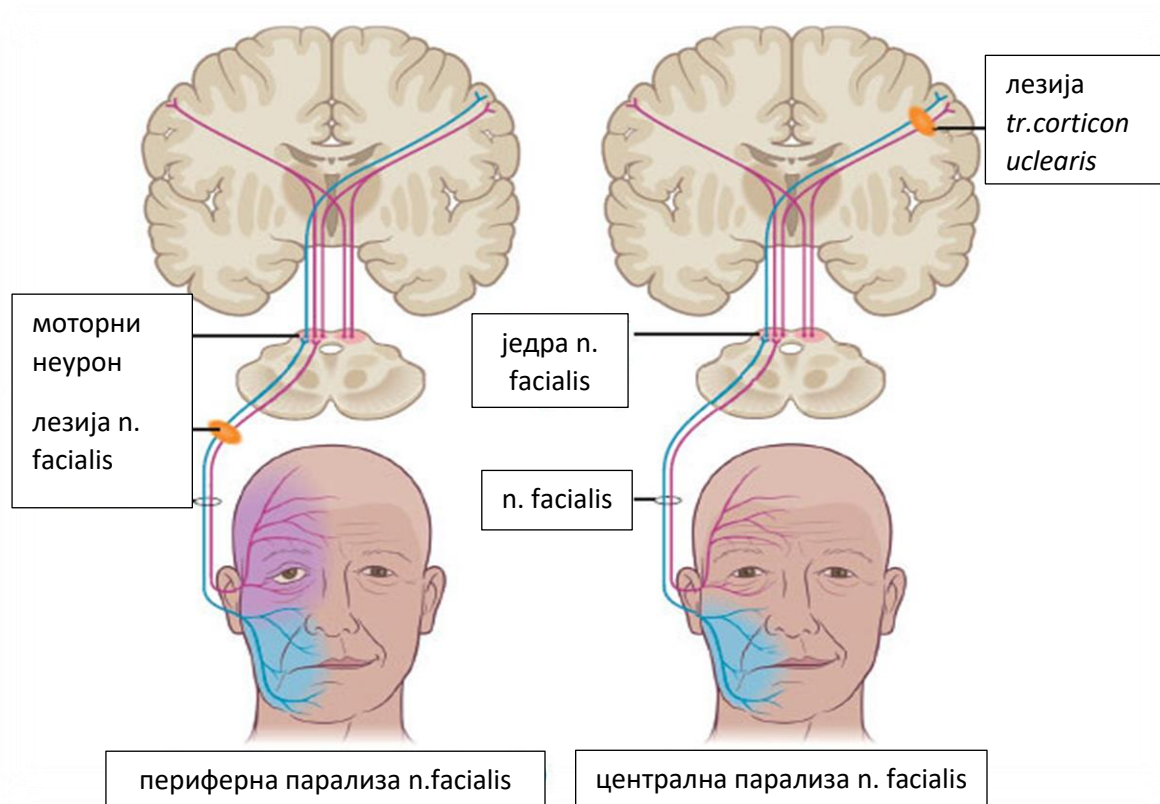
Моторно једро фацијалног нерва припада посебном висцеро-еферентном или брахијалном једру пошто инервише мишиће који потичу из другог брахијалног лука. Локализовано је дубоко у доњем делу ретикуларне формације моста (*pons*), тзв. *Varoliusovom mostu*, напред и бочно од једра абдуценса (*n. abduccens*) (9).

Највеће је кранијално моторно једро (дужине 4 *mm*, 7-10.500 ћелија), подељено на неколико мањих делова - вентромедијални, дорзомедијални, интермедијарни и латерални део. Из наведених делова потичу влакна за одговарајуће мимичне мишиће лица.

Вентромедијални део инервише платизму, дорзомедијални део ушне и потиљачне мишиће, интермедијарни део средње мишиће чела и кружни мишић ока док латерални део инервише образни мишић и периоралне мишиће (9).

Супрануклеарна контрола моторног једра фацијалног нерва се реализује кроз кортиконуклеарни пут (*tractus corticonuclearis*) који је одговоран за контролу вољних покрета лица и затварања очију. Аксони из горњег моторног неурона путују дуж ипсилатералног кортиконуклеарног пута до моста где већина влакана прелази на другу страну формирајући синапсе са доњим моторним неуроном (4,7).

Дорзални субнуклеус инервише мишиће лица ипсилатералног горњег квадранта и прима кортикобулбарне пројекције са обе хемисфере. Насупрот томе, латерални субнуклеус је повезан само са контралатералним кортиконуклеарним влакнима и инервише мишиће ипсилатералног доњег квадранта лица. Због ове разлике у инервацији, код оштећења горњег моторног неурона парализована је само контралатерална средња и доња трећина лица док је у случају оштећења доњег моторног неурона цела ипсилатерална половина лица погођена парализом (4,7) (Шема 1.2).



Шема 1.2. Укрштање влакана кортиконуклеарног пута

Главно моторно једро је одговорно за вољну контролу покрета мишића лица (10). Ова врста инервације мишића лица одређује радње које се морају научити, као што је једнострано трептање (намигивање), док се мишићи доњег дела лица најчешће асиметрично користе приликом мимике и жвакања. Центар за контролу периодичног трептања је у ретикуларној формацији стабла или у базалним једрима (2).

Висцерална једра фацијалног нерва су: *nucleus salivatorius superior*, *nucleus lacrimalis* и *nucleus tractus solitarii (pars superior)*.

Ефекторна парасимпатичка секреторна влакна потичу из *nc. salivatorius superior* и *nc. lacrimalis* те су ова једра класификована у функционалном погледу као висцероефекторна парасимпатичка једра (11).

Она шаљу своја секреторна преганглијска влакна преко фацијалног и глосифарингеалног нерва до птеригопалатинског и субмандибуларног ганглиона одакле одлазе секреторна и вазодилататорна влакна за пљувачне и сузне жлезде (9).

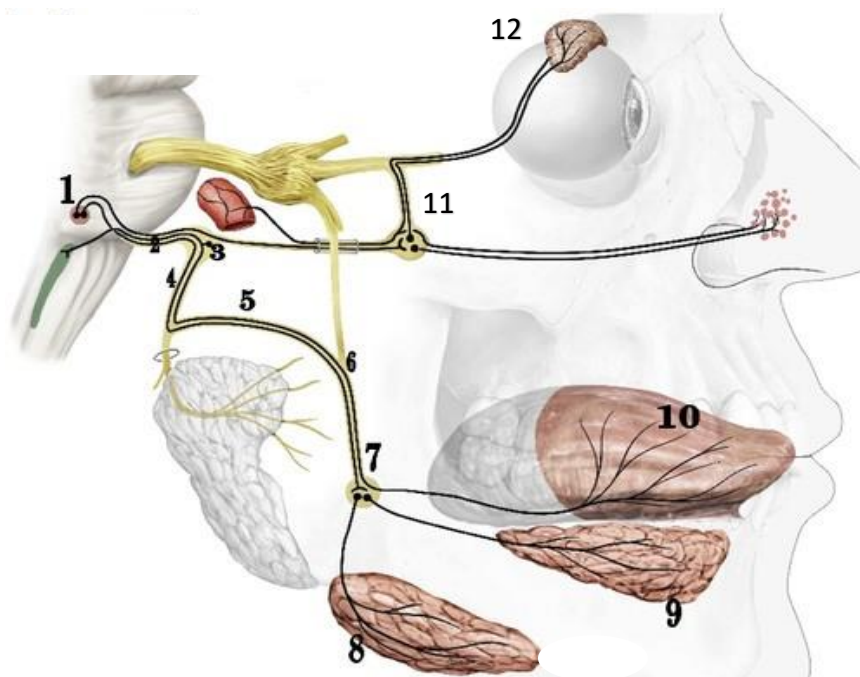
Посебно вегетативно аферентно једро (густаторне природе) је *nc. tractus solitarii (pars superior)*. Овај нуклеус генерално даје секретомоторна парасимпатичка влакна која су део великог петрозног нерва (*n. petrosus major*) и бубне врпце (*chorda tympani*) (4).

Наиме, нека преганглијска влакна из овог једра протежу се као део великог петрозног нерва, преко птеригоидног канала (*canalis pterygoideus*), где се спајају са постсинаптичким влакнима великог петрозног нерва (настаје из симпатичког комплекса *pl. caroticus internus*, из горњег цервикалног ганглиона) чиме се гради нерв птеригоидног канала (*n. canalis pterygoidei vidii*). Коначно, ова влакна формирају синапсе у птеригопалатинском ганглиону (*ganglion pterygopalatini*) који представља вегетативни парасимпатички ганглион главе одакле потичу постганглијска постсинаптичка влакна која инервишу сузну жлезду и мукозне жлезде носа, непца и ждрела (4-11).

Преганглијска парасимпатичка влакна су делимично распоређена у саставу бубне врпце (*chorda tympani*), која се прикључују језичном нерву (*n. lingualis*) и преко њега доспевају до субмандибуларног ганглиона (вегетативни парасимпатикус), а затим као постганглијска парасимпатичка вазодилататорна влакна до сублингвалних и субмандибуларних жлезда и малих пљувачних жлезда у предњем делу језика (4,5).

Nucleus tractus solitarii је заједничко једро за *n. facialis*, *n. glosopharyngeus* и *n. vagi*. Налази се у продуженој мождини, дорзолатерално или вентролатерално од дорзалног једра вагуса (*nucleus dorsalis n. vagi*). Неурони овог једра су нешто мањи од неурона дорзалног једра вагуса (2).

Овај ганглион прима густативне надражаје из предње две трећине језика (*papillae fungiformes i papillae foliatae*) преко аферентних сензорних влакана која су део језичног нерва, тј. бубне врпце, а затим улазе у састав тзв. посредног нерва (*n. intermedius*). Дакле, овај ганглион прима густативне сензације са предње две трећине језика преко периферних влакана ганглијских ћелија коленог ганглиона (*ganglion geniculi*) (4,7,9) (Шема 1.3).



Шема 1.3 Парасимпатичка секреторна инервација фацијалног нерва

1. nc. salvatorius superior 2. n. facialis 3. ganglion geniculi 4. n. intermedius 5. chorda tympani 6. n. lingualis 7. ganglion submandibularis 8. gl. submandibularis 9. gl. sublingualis 10. papillae fungiformes i papillae foliatae 11. ganglion pterygopalatinum 12. gl. lacrimalis

1.2.3. Функција фацијалног нерва (функционална категоризација нервних влакана)

Седми кранијални нерв има моторну (моторни еферентни пут), висцералну (секреторни еферентни пут), сензитивну и сензорну функцију (аферентни путеви) (4,7).

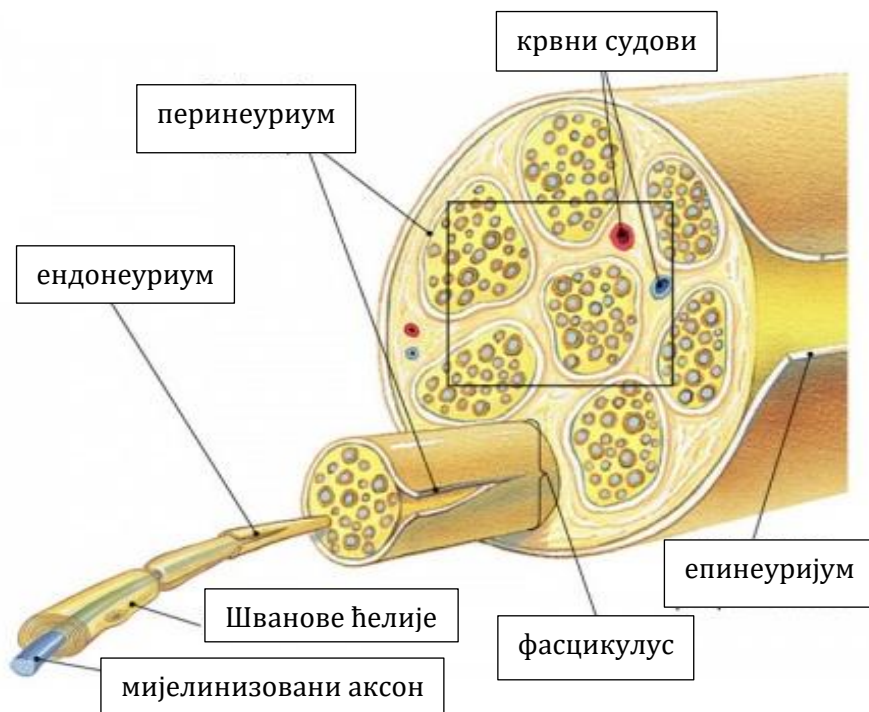
Фацијални нерв садржи посебну моторичку компоненту која се разликује од соматске моторне компоненте других нерава. Наиме, еферентна соматска моторна влакна сврставају се у функционалном смислу у тзв. специјална висцерална еферентна влакна која се означавају као брахијална моторна еферентна влакна (ENG. *branchial motor eferent, BE*) јер инервишу скелетне мишиће који се развијају из брахијалних лукова, а не из сомита (4,7).

Општа висцерална еферентна влакна (eng. *general visceral efferents, GVE*) инервишу сузну жлезду, субмандибуларне и сублингвалне пљувачне жлезде, као и слузницу носне дупље и слузницу која покрива тврдо и меко непце. Општа соматска аферентна влакна (eng. *general somatic afferent, GSA*) преносе на централни нервни систем осећај додира, бола и температуре из области спољашњег слушног канала (*meatus acusticus externus*) и дубљих делова ушне шкољке (кожа ушне шкољке у пределу *conhae*), као и из подручја коже иза уха и дела темпоромандибуларног зглоба.

Већина сензитивних влакана за ухо је део ушне гране вагуса (Арнолдов нерв) са којим фацијални нерв успоставља најмање две анастомотске везе (4,7,9).

Посебна аферентна влакна (*eng. special afferent, SA*) сензорне природе у виду дендрита ћелија *ganglion geniculi* потичу из густаторних папила предње две трећине језика (*papile fungiformes i papile foliate*) и одговорна су за чуло укуса (4,7).

Нервна влакна кранијалних нерава пружају се у малим сноповима названим фасцикулуси, који су у континуитету усмерени од центра ка периферији. Морфометријске студије су прецизно показале колико нервних влакана има у фацијалном нерву код људи. Стабло фацијалног нерва дистално од геникулатног ганглиона има 4-10 000. аксона, од којих су просечно 6.948 мијелизована. Влакна екстракранијалног сегмента фацијалног нерва су груписана у фасцикулусе који су обложени перинеуријумом (2). Перинеуријум ограничава дифузију великих молекула, а његово оштећење нарушава крвно-нервну баријеру и повећава притисак у фасцикулусу. Испод перинеуријума су влакна окружена везивном мембраном која се зове ендонеуријум који раздваја појединачна нервна влакна. Цео нерв је прекривен епинеуријумом (2) (Шема 1.4).



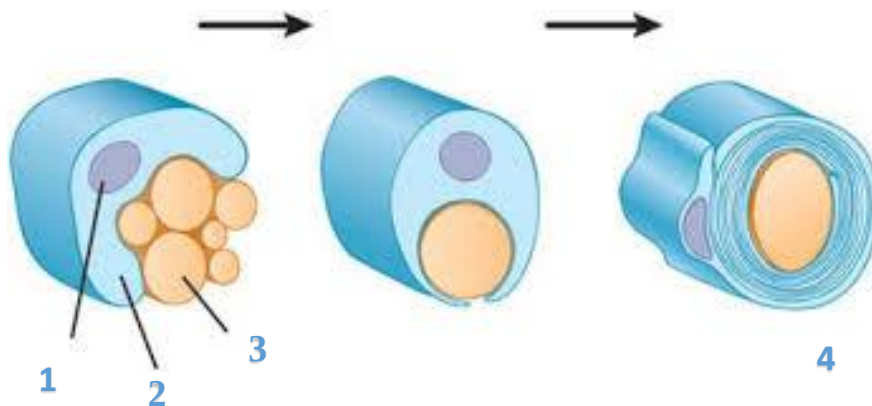
Шема 1.4 Екстракранијални део нерва

Постоје три карактеристичне разлике између интракранијалног и екстракранијалног дела фацијалног нерва (2).

У интракранијалном делу нервна влакна нису груписана у фасцикулусе, већ формирају јединствену структуру која смањује толеранцију на вучу, недостају перинеуријум и ендонеуријум па је нерв мање отпоран на истезање (перинеуријум) и компресију (епинеуријум). Нервно стабло није кривудавао што га чини мање отпорним на истезање, док су Шванове ћелије присутне само у екстракранијалном делу нерва. (2).

Главни ћелијски састав ендонеуријума су Шванове ћелије повезане са аксонима и ендотелијалне ћелије. Остале ћелије које су присутне у ендонеуријуму су фибробласти (4% од свих присутних ћелија), макрофаги (4%) и мастоцити (ретки у хуманим нервима).

Шванова (*Schwan*) ћелија представља неуроналну сателитску ћелију периферног нервног система и сви аксони су омотани у различитом степену овим ћелијама које стварају мијелин. Оне учествују у развоју и регенерацији нерва, неуронима дају трофичку потпору, модулишу неуромускуларну синаптичку активност, презентују антигене Т лимфоцитима, а једна од главних улога јесте формирање екстрацелуларног матрикса, односно ендонеуријума периферних нерава. Пореклом су из нервног гребена и припадају глијалним ћелијама периферног нервног система. Задржавају способност, да се деле у случајевима регенерације аксона. Митотска активност Шванових ћелија достиже максимум између 15. и 20. дана после трансекције нерва, а пролиферација се зауставља када је аксон комплетно регенрисан. Однос аксона и Шванових ћелија је 1:1 за мијелизоване аксоне (Шема 1.5).



Шема 1.5. Фазе мијелинизације-диференцијација Шванових ћелија

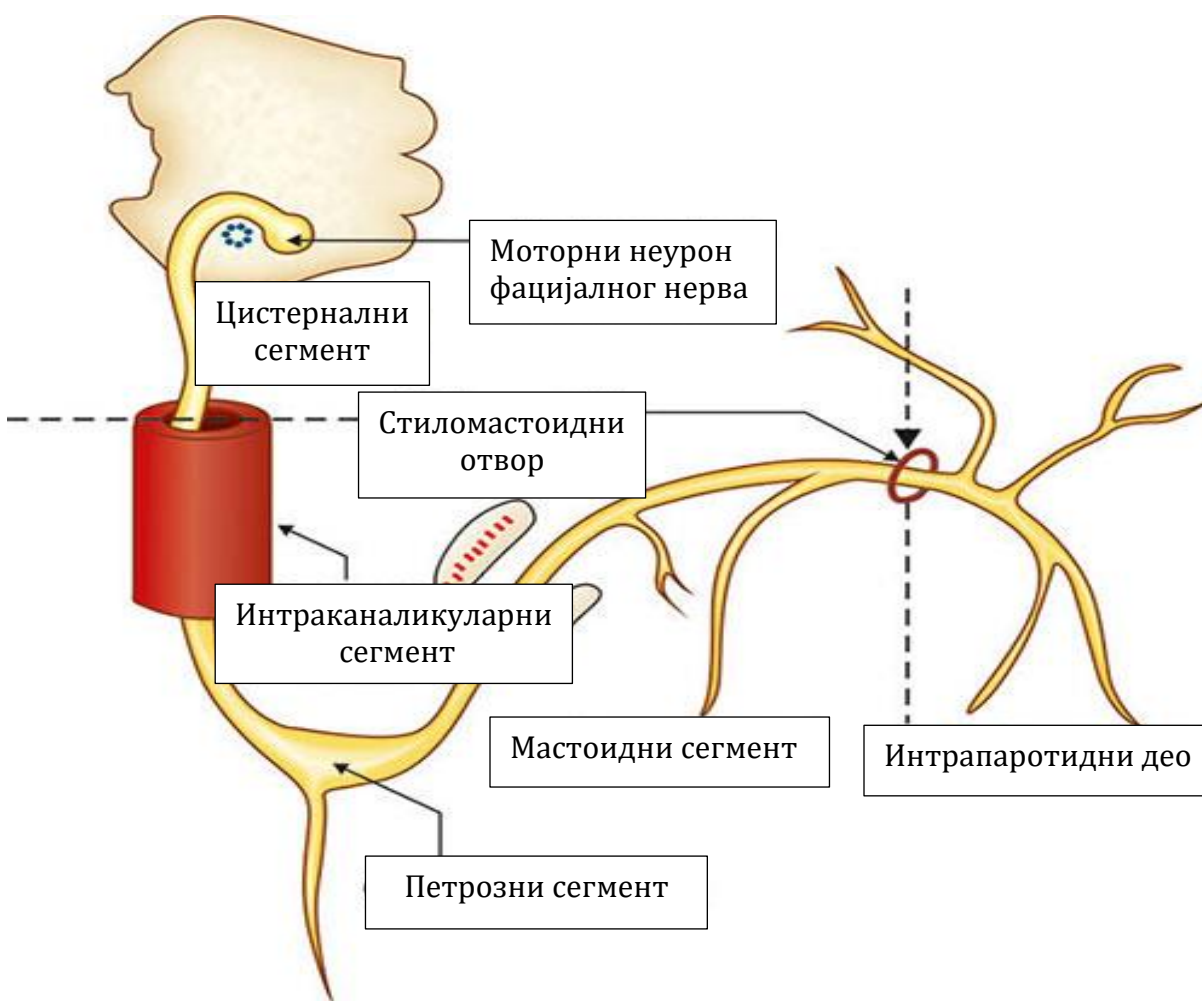
1- једро Шванове ћелије, 2- Шванова ћелија 3- аксон, 4- мијелизовани аксон

Код немијелинизованих аксона, група од 8 до 15 аксона омотана је једном ћелијом, односно њеном дупликатуром. У зрелом нервном ткиву распоређене су у ланцу дуж аксона. Свака Шванова ћелија мијелинизује између 0,15 и 1,5 мм аксона. Мијелин је протеофосфолипид у који је у више слојева увијена мембрана Шванове ћелије из које је елиминисана цитоплазма. Дебљина мијелинског омотача је сразмерна дебљини аксона. Моторни нерви имају сразмерно дебљи мијелински омотач од сензитивних. Мијелински омотач аксона није у континуитету, већ постоје прекиди у виду Ранвијерових (*Ранвиер*) чворова (нодуса) (2).

1.3. ТОПОГРАФСКА АНАТОМИЈА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

У свом интракранијалном делу, фацијални нерв има неколико топографских сегмената: цистернални, интраканалкуларни, петрозни сегмент (лабиринт, тимпанични и мастоидни део), сегмент у стилемастоидном отвору и екстракранијални сегмент у паротидној ложи (7) (Шема 1.6).

Фацијални нерв је од тачке излаза из моста (*pons*) до формирања паротидног плексуса (*res anserinus major*) дугачак између 56 и 74 mm (7,12).



Шема 1.6. Пут фацијалног нерва

Цистернални сегмент нерва је дугачак 16-24 mm, са пречником око 2,5-3,5 mm (2).

Овај сегмент се односи на пут нерва од изласка из можданог стабла, преко можданих овојница до спољашњег слушног канала (*meatus acusticus externus*). Моторна влакна фацијалиса, након адхерирања на мост (*pons*) у дужини од 2-3 mm протежу се нагоре и бочно у понтоцеребеларној цистерни. Првих 2,5-3,5 mm нерва поред можданог стабла формирају „улазну коренску зону“ (“*root entry zone*”) (2).

Прелазак централног (тањег) мијелина на периферни повећава осетљивост нерва на компресију. Зона корена теоретски одговара зони где се олигодендроцити смењују са Швановим ћелијама, односно зони формирања периферних нерава (5).

Улазна коренска зона фацијалног и интермедијалног нерва је краћа него код вестибулокохлеарног нерва који је прекрива заједно са флокулусом малог мозга (2).

У самом понтоцеребеларном углу, *n. facialis* и *n. intermedius* налазе се изнад и испред *n. vestibulocochlearis* при чему је *n. intermedius* смештен између ова два нерва (7).

Интраканаликуларни сегмент представља део фацијалног нерва који се налази заједно са вестибулокохлеарним нервом и артеријом лабиринта у спољашњем слушном каналу. Приближавајући се унутрашњем слушном каналу, нерви се ротирају у смеру супротном од казаљке на сату за 90 степени, тако да је у каналу део фацијалног нерва положен напред и горе, вестибулокохлеарни нерв је сасвим позади док интермедијални нерв лежи између њих. У овом ходнику долази до спајања моторних и сензитивних коренова фацијалног нерва. На дну ходника (*fundus mestus acustici interni*) *n. facialis* улази у предњи горњи квадрант, односно у његов коштани канал (*canalis facialis Fallopi*) у пирамиди темпоралне кости (7,9).

Петрозни сегмент (*canalis facialis Fallopi*) се састоји од три дела: *segmentum labyrinthicum*, *segmentum tympanicum* и *segmentum mastoideum*.

Фацијални нерв у петрозном сегменту се налази у свом каналу у пирамиди темпоралне кости, а уједно је и нерв са најдужим током кроз коштани канал. Ова анатомска посебност условљава специфичне компликације код различитих инфламаторних процеса у ЦНС-у и трауматских оштећења темпоралне кости (13).

Лабиринтни сегмент фацијалног нерва је најкраћи (2,5-6) *mm*, наставља смер унутрашњег слушног канала напред и споља, налази се непосредно изнад базе пужа (*cochlea*), између пужа и вестибулума унутрашњег уха, завршава се троугластим коленим ганглионом (*ggn. geniculi*) који се налази у првом колену фацијалног канала (*genu n. facialis*) (2). Ганглион је од пода средње лобањске јаме одвојен танком коштаном ламелом која недостаје у 15% случајева па се ганглион наслања на дуру, услед чега је при хируршким интервенцијама изложен трауми (2).

Сегмент лавиринта је најужи део фацијалног нерва и осетљив је на компресију изазвану едемом. То је једини сегмент фацијалног нерва који нема анастомозу између артерија те је због васкуларне компресије и смањеног протока крви подложен емболијама (5,7).

Тимпанични сегмент фацијалног нерва је дугачак око 8-11 *mm* и протеже се од *ganglion geniculi* до хоризонталног дела полукружног канала. Нерв пролази иза *processus cochleariformis* и *tensor tympani*, тако да је *processus cochleariformis* користан оријентир за проналажење фацијалног нерва. Нерв се налази наспрам медијалног зида *cavum tympani*, изнад и иза *fenestra vestibuli*. Зид може бити веома танак или са дехисценцијом у овој области тако да слузница средњег ува може доћи у директан контакт са фацијалним нервом (5). Дистални део фацијалног нерва излази из средњег уха између задњег зида спољашњег слушног канала и хоризонталног полукружног канала (7).

Налази се само дистално од пирамидалне еминенције где фацијални нерв формира друго колено. Најважнији оријентир за препознавање фацијалног нерва у мастоидном наставку су хоризонтални полукружни канал, *fossa incudis* и дигастрични гребен (7).

Друго колено фацијалног нерва протеже се инферолатерално до бочног полукружног канала и то је релативно константан однос. Нерв се затим поново оштро okreће надоле испод улаза у мастоидну пећину (*antrum mastoideum*) и достиже вертикални положај (7).

Мастоидни сегмент фацијалног нерва представља део нерва који се пружа кроз задњи зид истоимене бубне дупље. Друго колено означава почетак сегмента мастоидног наставка. Ово колено се налази бочно и иза *processus pyramidalis*. Нерв наставља вертикално наниже дуж предњег зида мастоидног наставка до стиломастоидног отвора (4). Мастоидни сегмент је најдужи део петрозног сегмента фацијалног нерва и дугачак је око 15 mm (2).

У хирургији средњег уха честе су повреде фацијалног нерва у овом сегменту. У мастоидном сегменту, фацијални нерв даје две гране, *n. stapedius* и *chorda tympani*. Дуж овог сегмента, фацијалном нерву се прикључује комуникантна грана из *r. auricularis n. vagi* (Арнолдов нерв) који настаје у југуларном отвору и повезује се са фацијалним нервом испод тачке раздвајања са нервом мишића узенгије (*n. stapedius*). Преко овог нерва може се пренети бол из региона спољашњег слушног канала (4).

Фацијални нерв је у блиској вези са околним коштаним структурама, најкраћа удаљеност до спољашњег слушног канала је 2,9 mm, до сигмоидног синуса 10,5 mm, до тврде овојнице задње лобањске јаме 7,3 mm и до бочне површине мастоида 15,3 mm (2).

Топографски део путање фацијалног нерва, који чини сегмент кроз стиломастоидни отвор и паротидну жлезду, настаје проласком нерва кроз стиломастоидни отвор између стилоидног и мастоидног наставка након чега наставља свој пут напред и доле између дигастричног и стилохиоидног мишића и улази у паротидну жлезду.

У ткиву паротидне жлезде даје терминалне гране моторног типа које су распоређене према бочној страни главе, лица и горњег дела врата, инервишући поткожне мишиће ових анатомских региона (7).

Хируршки оријентир за идентификацију фацијалног нерва у овом сегменту су линија тимпаномастоидне сuture, трагус ушне шкољке и задњи трбух дигастричног мишића. Тимпаномастоидна сатура лежи између мастоидног наставка и тимпаничног сегмента темпоралне кости и налази се 6-8 mm бочно у односу на стиломастоидни отвор. Главно стабло нерва може се наћи на пола пута (10 mm постериорно) између медијалне ивице трагусне хрскавице, такозваног трагусног оријентира и задњег трбуха дигастричног мишића. Нерв се обично налази латерално и инфериорно у односу на овај оријентир (5,7). У паротидној жлезди, фацијални нерв се дели на две главне гране, *truncus temporofacialis* и *truncus cervicofacialis* од којих се одвајају завршне гране (4,7).

Три ганглиона су повезана са фацијалним нервом - *ganglion geniculi*, *ganglion submandibulare* и *ganglion pterygopalatinum* (4).

Колени ганглион (*ganglion geniculi*) се првенствено састоји од униполарних сензорних и сензитивних неурона. Он прима влакна из сензитивних, сензорних, парасимпатичких и моторних компоненти фацијалног нерва и шаље влакна која инервишу сузну, субмандибуларне и сублингвалне жлезде, језик, непце, ждрело, спољашњи слушни канал, мишић узенгије, задњи трбух дигастричног мишића, стилохиоидни мишић и мимичне мишиће лица (4).

Субмандибуларни ганглион (*ganglion submandibularis*) је мали ганглион у облику вретена, који се налази изнад дубоког дела субмандибуларне пљувачне жлезде. Лежи на хипоглосном мишићу близу задње ивице милохиоидног мишића (4).

Ганглион прима две групе нервних влакана која се одвајају од лингвалног нерва (*n. lingualis* гране *n. mandibularis*, V3) – предњу и задњу. Преко ове друге групе прима влакна из бубне врпце, која се пружају заједно са лингвалним нервом (као његов „омотач“) (4).

Ganglion pterygopalatinum (с. *ganglion sphenopalatinum*) је парасимпатички ганглион који се налази у птеригопалатинској јами (*fossa pterygopalatina*). Углавном добија влакна од великог петрозног нерва (гране фацијалног нерва која се одваја од њега на нивоу коленог ганглиона). Постганглијска влакна овог ганглиона се пројектују у сузну жлезду и слезницу носа и непца (4).

1.3.1. Бочне и анастомотичне гране фацијалног нерва

Већина нерава који се одвајају од фацијалног нерва су заправо комуникантне гране, преко којих *n. facialis* размењује влакна са другим нервима и нервним плексусима.

У пирамиди темпоралне кости из фацијалног нерва се одвајају: *n. petrosus major*, *n. stapedius*, *chorda tympani* и сензитивне гране за аурикуларни регион. На нивоу тимпаничног сегмента нема гранања фацијалног нерва (4).

Анастомоза са птеригопалатинским ганглионом успоставља се преко великог петрозног нерва (*n. petrosus major*) који се одваја од фацијалиса на нивоу коленог ганглиона.

На нивоу *foramen lacerum* велики петрозни нерв спаја се са дубоким петрозним нервом (*n. petrosus profundus*) и завршавају се као заједничка грана у ганглиону смешеном у птеригопалатинској јами (7).

Постганглијска влакна из овог ганглиона инервишу преко максиларног нерва (*n. maxillaris*-V2) и његових грана (*n. zygomaticus*) сузну жлезду, носне, непчане и фарингеалне жлезде. Усходно, *n. petrosus major* такође преноси део густативних влакана из непца преко великог и малог непчаног нерва (*n. palatinus major et minor*). Овај нерв, такође обезбеђује парасимпатичку инервацију сфеноидних, фронталних, максиларних и етмоидних синуса и носне шупљине.

Nervus petrosus major садржи и густаторна влакна из меког непца која долазе преко *n. palatinus minor et n. palatinus major* (7).

Анастомоза са отичким ганглионом (*ganglion oticum*) почиње од коленог ганглиона или од корена *n. petrosus major*, улази у *n. petrosus minor* и завршава се у поменутом ганглиону.

Nervus stapedius је танка грана која се одваја од фацијалног нерва непосредно изнад *eminetiae pyramidalis*. У овом простору се налази мишић узенгије (*m. stapedius*), најмањи мишић у људском телу, који је инервисан овом граном (4,7).

Бубна врпца (*chorda tympani*) је терминална грана интермедијалног нерва и представља анастомотичну грану са лингвалним нервом. Одваја се од вертикалног (мастоидног) сегмента фацијалног нерва на око 6 mm изнад стилмастоидног отвора.

Нерв пролази кроз уски каналић *paries mastoideus* бубне дупље у коју улази, пробијајући се кроз њен задњи коштани зид где има лучни ток на унутрашњој страни бубне опне између *pars flaccidae* и *pars tensae* и пролази између врата чекића и другог крака наковња, уздиже предње и задње наборе слезнице чекића (*plica chordae tympani*) (4,7).

Дошавши до предњег зида бубне дупље, излази кроз петротимпаничну пукотину (*fissura petrotympanicu-canalі Huguier*) иза темпоромандибуларне артерије (*a. temporomandibularis*), укршта средње možдану артерију (*a. meningа media*) и почетни део аурикулотемпоралног нерва (*n. auriculotemporalis*). Са задње стране под оштрим углом прикључује се језичном нерву (*n. lingualis*) у инфратемпоралној јами (*fossa intratemporalis*) (4).

Након укрштања са *a. meningа media*, *n. auriculotemporalis* и *n. alveolaris inferior, chorda tympani* под оштрим углом улази у састав лингвалног нерва и завршава се на густаторним папилама (*papillae fungiformes, papillae foliate*) предње две трећине језика и субмандибуларном ганглиону чија постганглијска влакна инервишу субмандибуларне и сублингвалне пљувачне жлезде. Сензорна влакна са задњег зида спољашњег слушног канала одговорна су за температуру, бол и додир (4,7).

Ванпетрозне бочне гране фацијалног нерва су: *n. auricularis posterior, r. digastricus, r. stylohyoideus* и *r. cutaneiі* (4,7).

Аурикуларна грана (*n. auricularis posterior*) инервише задње ушне и закржљале унутрашње мишиће ушне шкољке, одваја се непосредно испод стилмастоидног отвора, пролази између спољашњег слушног канала и предње ивице мастоидног наставка пратећи истоимену артерију. Окципитална грана је дужа, пролази дуж и иза *linea nuchae superior* окципиталне кости и инервише *m. occipitofrontalis* (4,7).

Ramus digastricus се такође одваја одмах по изласку нерва из стилмастоидног отвора и грана се на неколико грана које инервишу задњи трбух дигастричног мишића, а један од њих се повезује са глософарингеалним нервом (4,7).

Ramus stylohyoideus се често одваја заједно са *ramus digastricus*, али је и дужи и тањи од њега. Овај нерв досеже до стилохиоидног мишића (средњи део) и инервише га.

Ramii cutaneiі су гране које инервишу кожу ушне шкољке у пределу њене конхе. Ова сензорна влакна прикључују се *r. auricularis n. vagi* (4,7).

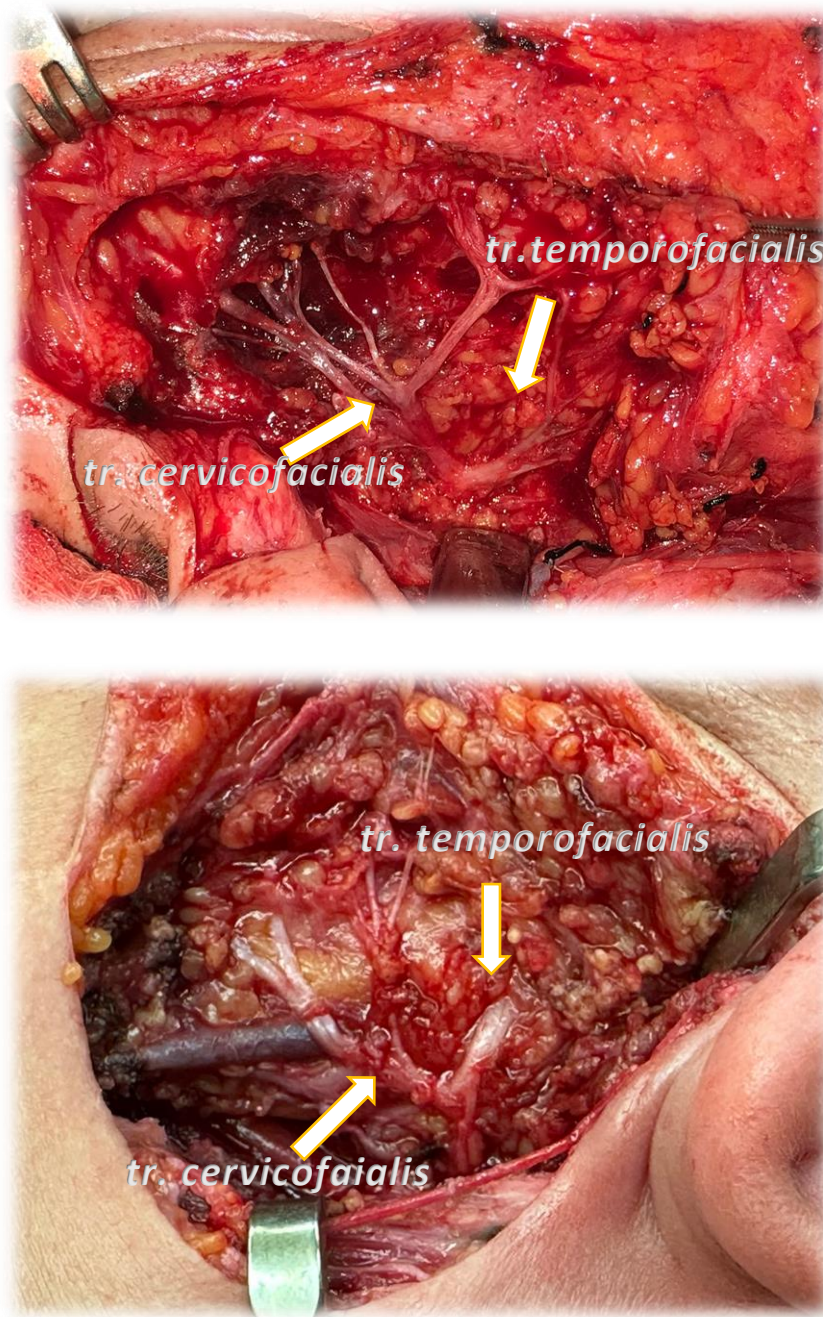
Фацијални нерв у наведеним сегментима даје велики број комуникантних грана са осталим кранијалним нервима и њиховим плексусима (Табела 1.1).

Табела 1.1 Комуникација фацијалног нерва са другим нервима и нервним плексусима.

Сегмент	Комуникација
<i>meatus acusticus externus</i>	<i>n. vestibulocochlearus</i> (VIII) <i>ganglion pterygopalatinum</i> преко <i>n. petrosus major</i>
<i>ganglionu geniculi</i>	преко <i>n. petrosus minor</i> са <i>ggn. oticum</i> преко <i>n. petrosus profundus</i> са симпатичким сплетом око <i>a. meningae mediae</i>
<i>canalis facialis</i>	са <i>r. auricularis n. vagi</i>
<i>foramen stilomastoideum</i>	са <i>n. glossopharyngeus</i> (IX) и <i>n. vagus</i> (X) са <i>n. auricularis magnus</i> са <i>n. auriculotemporalis</i>
Иза уха	са <i>n. occipitalis minor</i>
У пределу лица	са <i>trigeminalnim ganglionom</i> и <i>n. trigemini</i>
У пределу врата	са <i>ramus cervicalis</i> и <i>n. transversus cervicalis</i>

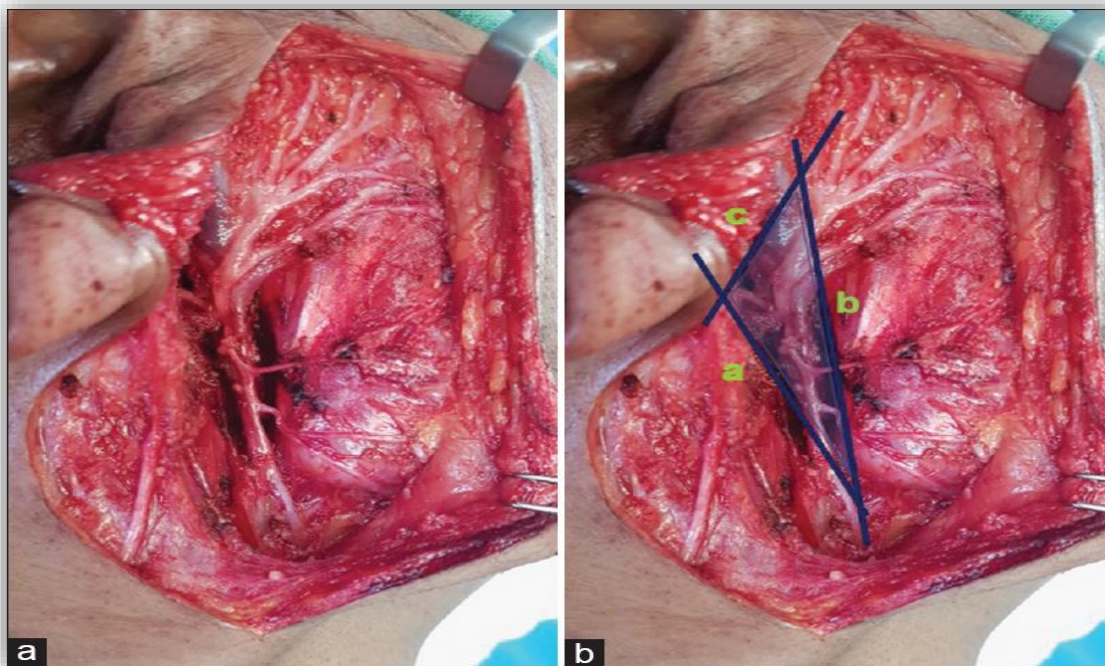
1.3.2. Завршне гране фацијалног нерва

Након изласка кроз стилемастоидни отвор до места гранања на завршне гране дужина стабла фацијалног нерва износи од 15 до 20 mm. Фацијални нерв се у паротидној жлезди дели на две главне гране (*pes anserinus*, гушчје стопало): супериорно усмерену темпорофацијалну грану - *truncus temporofacialis* и инфериорно усмерену грану - *truncus cervicofacialis* од којих се одвајају завршне гране (4,7) (Слика 1.2).



Слика 1.2. Гране фацијалног нерва (из архива Клинике за МФХ ВМА)

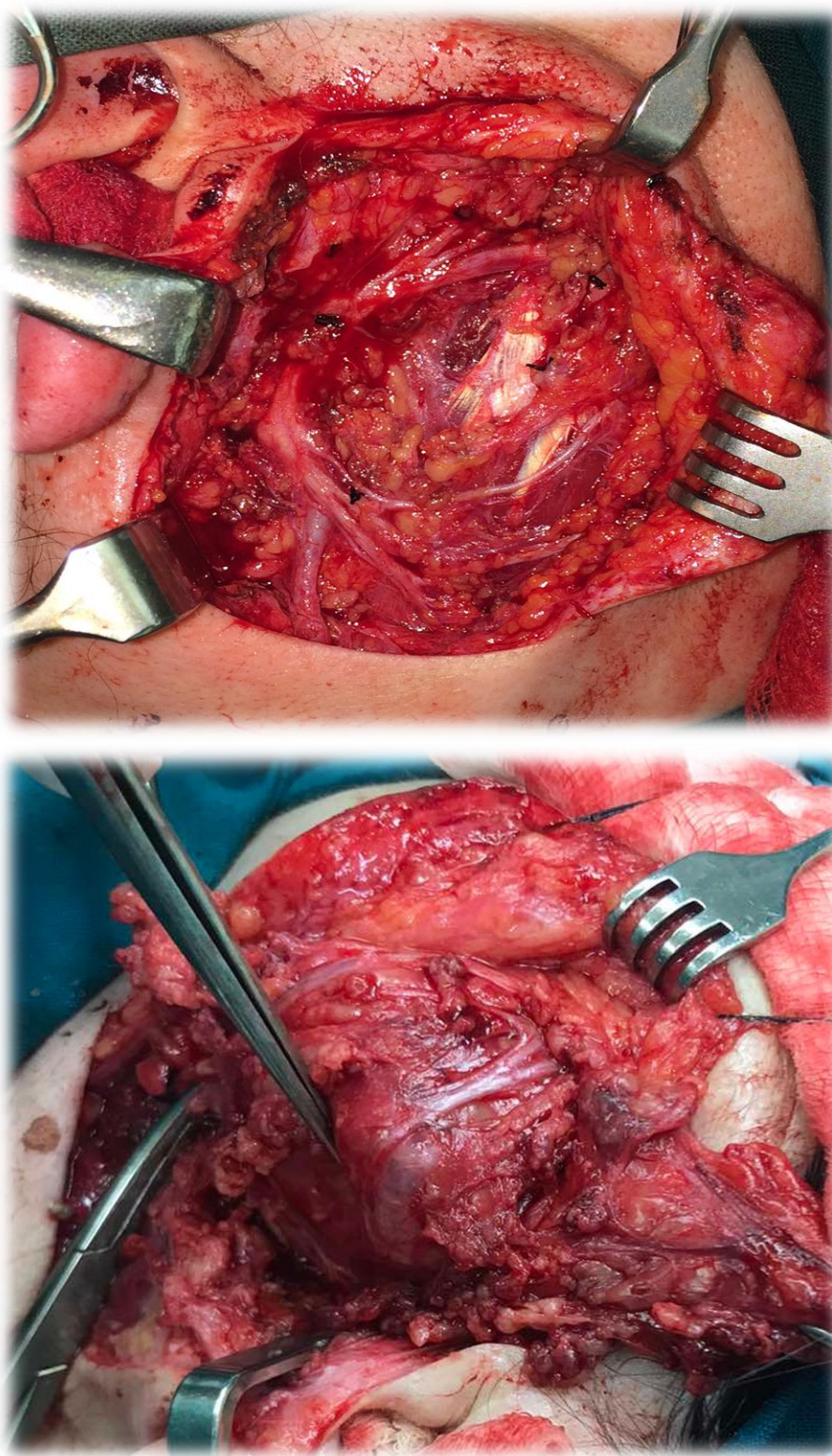
Тачка идентификације стабла фацијалног нерва у пределу паротидне пљувачне жлезде се налази у оквиру Борлеовог троугла (14). Троугао формирају доња ивица мастоидног наставка, задња ивица рамуса мандибуле и горња граница задњег трбуха дигастричног мишића (Слика 1.3).



Слика 1.3. Борлеов троугао а - трункус и гране фацијалног нерва б - границе троугла
а-линија повучена дуж горње границе задњег трбуха дигастричног мишића до врха
мастоидног наставка,
б-линија повучена дуж задње ивице рамуса мандибуле
с- линија која иде напред од врха мастоидног наставка и спаја се са линијом „б”,

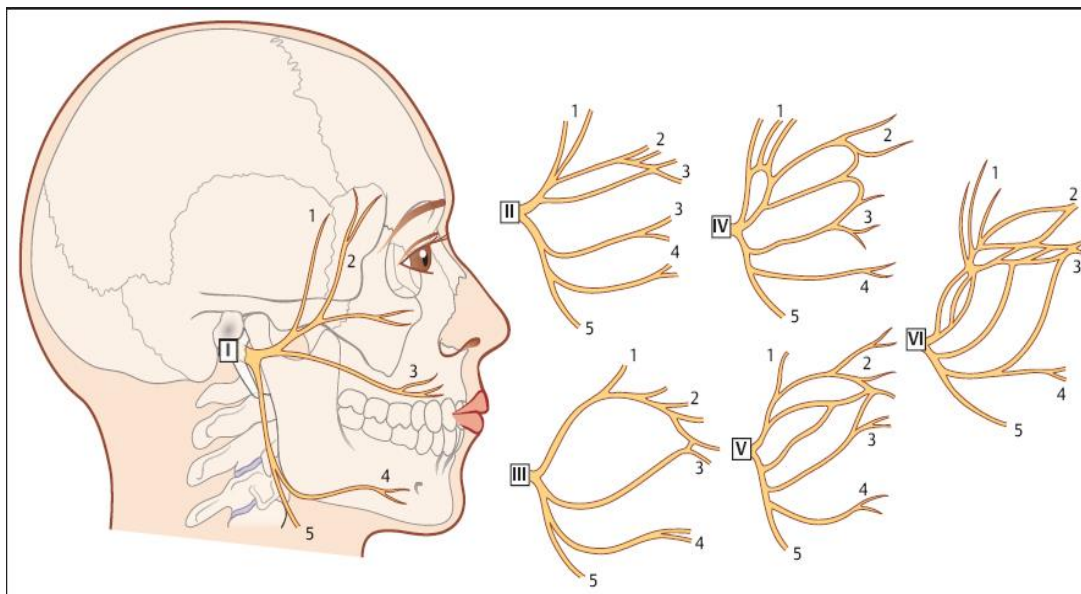
Нервно стабло се налази на око 9-15 *mm* од угла између линија „а” и „с”. Ова топографска структура је веома важна приликом хируршке идентификације стабла фацијалног нерва (14).

Познавање броја и међусобне комуникације грана паротидног плексуса објашњава честе испаде у инервационом подручју фацијалног нерва после хируршких интервенција са полиморфизмом клиничке слике. Распоред и пут завршних грана фацијалног нерва кроз паротидну пљувачну жлезду може условити учестале јатрогене повреде при хируршким интервенцијама у пределу лица посебно у паротидној ложи. Као једна од најчешћих локализација тумора која се завршава високим процентом посоперативних пареза фацијалног нерва јесу тумори дубоког режња паротидне пљувачне жлезде, због положаја грана фацијалиса које се најчешће налазе изнад тумора (Слика 1.4).



Слика 1.4. Завршне гране фацијалног нерва са тумором у дубоком режњу (из архива слика Клинике за МФХ ВМА)

Велики број анатома је покушало да међусобне односе завршних грана фацијалног нерва обједини класификацијама на једноставан и хируршки прихватљив начин. Дејвис (*Davis*) 1956. године објављује шест различитих образаца комуникације између грана паротидног плексуса (15) (Шема 1.7).



Шема 1.7. Дејвисова класификација комуникација грана паротидног плексуса
Тип I-13%, Тип II – 20%, Тип III – 28%, Тип IV – 24%, Тип V – 9% , Тип VI – 6%

Кац и Каталано (*Katz i Catalano*) су 1987. године описали класификацију са девет врста комуникација уз два нова критеријума везана за порекло и број букалних грана (15). Данас се примењују две популарне класификације - класификација коју је 1994. године предложио Копуз (*Kopuz*) на основу двоструког стабла фацијалног нерва и класификација из 2004. године коју је предложио Квака (*Kwaka*) на основу порекла букалне гране (15).

Број завршних грана фацијалног нерва и њихова међусобна комуникација свакако представљају велики проблем приликом хируршких интервенција у пределу лица, посебно у пределу паротидне ложе са високим степеном постоперативних компликација у инервационом подручју фацијалног нерва (парезе 18-65%, парализе 0-19% случајева) (16).

Све гране паротидног плексуса инервишу искључиво мимичне мишиће лица чији се испади презентују функционалним и естетским деформитетима целе половине или делова лица у зависности која грана је повређена. Превенција наведених компликација је свакако добро познавање топографских односа грана паротидног плексуса са осталим анатомским структурама лица.

Темпоралне гране (*ramii temporales* укупно 2-3) излазе на површину зигоматичног лука (*arcus zygomaticus*), одакле се протежу укосо преко зигоматичне регије и инервишу *m. auricularis anterior et superior*, *m. occipitofrontalis (venter frontalis)*, *m. orbicularis oculi* и *m. corrugator supercilii* (4,7).

Темпоралне гране се налазе антероинфериорно у односу на темпоралну артерију, што представља сигуран оријентир за њихово очување током препарације. Просечна дужина темпоралне гране је 30,1 mm, са пречником око 0,93 mm (15).

Зигоматичне гране (*ramii zygomatici*) прелазе преко зигоматичне кости, настављају ка бочном зиду орбите где инервишу латерални део *m. orbicularis oculi* (4,7).

Зигоматичне гране је лако идентификовати ако се прате безбедне препарационе зоне (17). Просечна дужина зигоматичне гране је 38,0 mm, а пречник 1 mm (15).

Букалне гране (*ramii buccales*) се најчешће презентују у виду једноструког нерва, али могу да се јаве и две гране. Ове гране се налазе у непосредној близини паротидног канала и са њим су најчешће паралелне. Инервишу већину мишића лица у пределу образа (*m. zygomaticus minor*, *m. levator labii superioris*, *m. levator labii superioris alaeque nasi*, *m. risorius*, *m. buccinator*, *m. levator anguli oris*, *m. orbicularis*, *m. nasalis - pars transversa*, *m. nasalis - pars alaris*) (4,7).

Варијабилност букалних грана је велика, у 47,37% случајева произилазе из темпорофацијалног стабла, у 42,17% произилазе из цервикофацијалног стабла док у 10,52% настају као двоструке гране из оба дела које се спајају у једану грану.

Просечна дужина букалне гране је 37,8 mm, а пречник 0,99 mm (15).

Маргинална грана (*ramus marginalis mandibulae*) у облику једне или две гране се пружа према напред и надоле. Ова грана прелази преко масетеричног мишића и тела доње вилице. Непосредно испод доње ивице мандибуле укршта *a. facialis* на удаљености до 3 cm од угла доње вилице и улази у мишић. Инервише мишић смеха (*m. risorius*) и мишиће усана и браде (4,7).

У 84,2% случајева формира се у виду једне гране док у 15,8% случајева може бити двострука. Просечна дужина маргиналне гране је 33,1 mm, а пречник 0,9 mm (15).

Вратна грана (*ramus colli s. cervicalis*) се спушта испод ивице мандибуле, пружа се од доњег дела паротидне жлезде до предње стране врата и инервише *platizmu*, једини поткожни мишић врата (4,7).

Дужина цервикалне гране је 12,7 mm, а пречник 0,15 mm (15).

Ове гране инервишу све мимичне мишиће лица, од чега завршне гране фацијалног нерва инервишу 14. од 17. парних група мишића лица док преостала три пара мишића (*m. buccinator*, *m. levator anguli oris* и *m. mentalis*) инервише *n. facialis* својим површним или бочним гранама (4,7).

Анастомозе између грана паротидног плексуса су високо полиморфне и чешће се јављају на нивоу темпорофацијалног стабла: темпоро-зигоматичне комуникације у 28,95%, зигоматико-зигоматичне анастомозе у 13,16% и зигоматично-букалне у 60,53% случајева.

Када је у питању цервикофацијално стабло, број анастомоза је знатно мањи: букално-мандибуларне анастомозе чине 42,11%, а маргинално-цервикалне анастомозе свега 5,26% случајева (15).

Када је реч о комуникантним гранама паротидног плексуса са другим нервима, осим раније описане фацијално-тригеминалне анастомозе, уочене су везе између инфраорбиталног нерва и зигоматичних или букалних грана (18), као и везе између маргиналне гране и менталног нерва (Табела 1.1) (19).

Велики број анастомоза, било да се ради о комуникацијама између грана паротидног плексуса или везама са суседним кранијалним нервима, свакако повећава степен могуће дисфункције фацијалног нерва са полиморфном клиничком сликом након хируршких интервенција у пределу главе и врата.

1.3.3. Васкуларизација фацијалног нерва

Фацијални нерв добија васкуларизацију од четири крвна суда: 1) *a. cerebelli inferior anterior* (у понтоцеребеларном углу), 2) *a. labirinti* (гране *a. cerebelli inferior anterior.*), 3) *a. petrosa superficialis* (грана *a. meningae mediae* која исхрањује *ganglion geniculi* и околне структуре) и 4) *a. stylomastoidea* (гране *a. auricularis posterior*; ова артерија исхрањује нерв и његов део дистално од *foramen stylomastoideum*) (4,7).

У екстракранијалном делу пута фацијални нерв добија васкуларизацију од *a. occipitalis*, *a. stylomastoidea*, *a. temporalis superficialis* и *a. transversa faciei* (2).

1.4. ЕМБРИОНАЛНИ РАЗВОЈ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА (општа разматрања)

Комплексну анатомију фацијалног нерва и бројне клиничке поремећаје његове функције је лакше разумети уз познавање основних чињеница о ембрионалном развоју.

Фацијални нерв потиче од другог брахијалног лука (хиоидног лука) који се врло рано појављује у акустико-фацијалном комплексу. Моторни део произлази из базалне плоче ембрионалног *ponsa*, а сензорни из нервног гребена. Овај комплекс садржи соматске и брахијалне елементе једара кранијалних нерава у јукстапозицији, што је делимично одговорно за анастомозирање тригеминалног и фацијалног нерва. Ток фацијалног нерва, гране и анатомски односи се могу јасно уочити у трећем месецу живота, а свој пуни развој нерв достиже око четврте године живота (20,21).

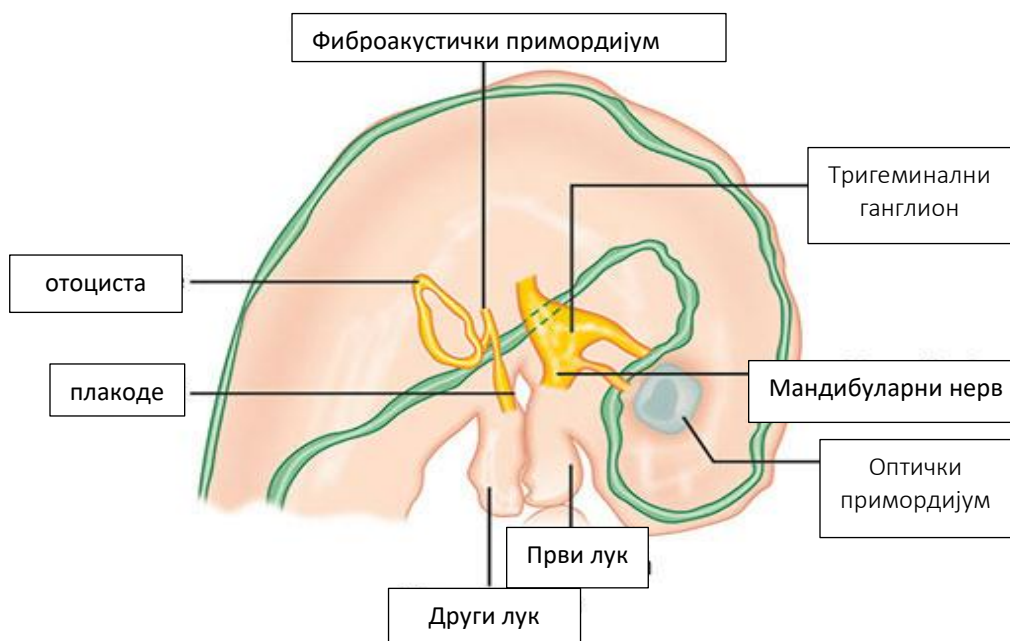
Ткиво фацијалног нерва се идентификује најраније у трећој недељи гестације, када се појављује *фацио-акустични примордијум или гребен* (20,21).

Епибрахијалне плакоде настају од такозваног „*нан плакодалног*” региона, бројни регулаторни фактори контролишу диференцијацију посебних плакода.

Кранијалне неурогене плакоде настају од задебљања ектодерма на предњој страни неуралне плоче (пре-плакодни регион) (22).

Фибробластни фактори раста који се луче из неуралне плоче и мезодерма индукују усмеравање пре-плакодалног региона, а на овај процес утиче и локална редукција коштаних морфогених протеина. Плакоде садрже кластере прогениторских ћелија које ће се даље развијати у правцу сензорних или неуросекреторних органа (22).

Крајем четврте недеље јасно се разликују фацијални и акустични део плакоде, фацијални део надраста плакоду, а акустични део постаје отоциста (20) (Шема 1.8).



Шема 1.8 . Четврта недеља ембрионалног развоја

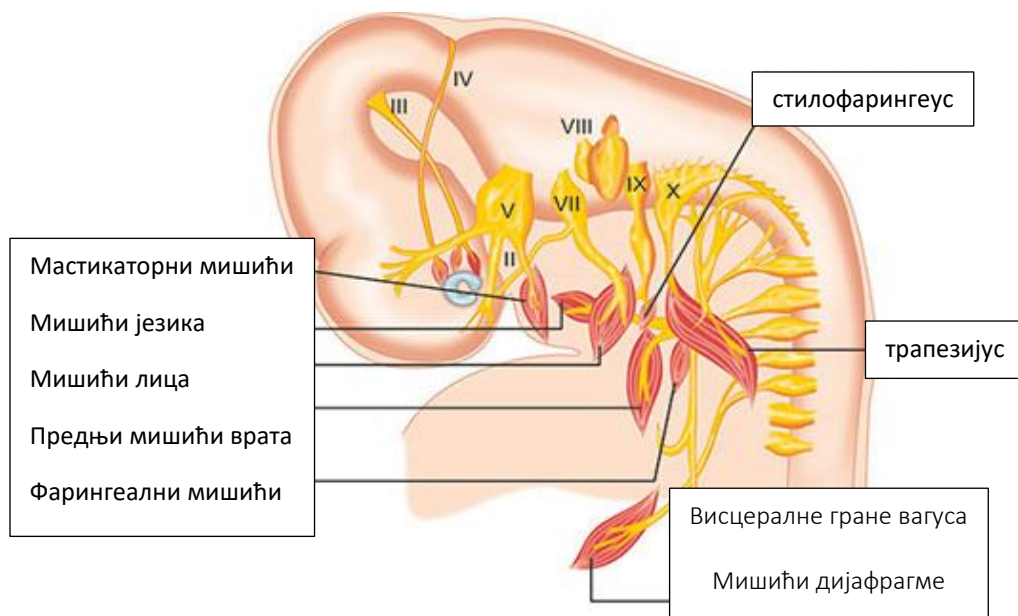
У петој недељи формира се *ganglion geniculi* из дисталног дела примордијума.

Прва грана нерва у ембрионалном развоју је *chorda tympani* изнад које се у петој недељи формира петрозни нерв (23).

Код ембриона дужине 14 mm, *ganglion geniculi* и *n. petrosus superficialis major* су већ добро развијени, а епибранхијалне плакоде нестају. Поменути нерв иде вентрално и рострално, спаја се са *n. petrosus profundum* на латералном зиду зачетка *a. carotis internae* (будућег нерва птеригоидног канала) и завршава се у групи ћелија које ће дати *ganglion pterygopalatinum* (20).

Почетком шесте недеље формира се моторно једро фацијалног нерва

Средином шесте недеље из вентралног дела коленог ганглиона (*ganglion geniculi*) настаје грана за глософарингеални ганглион, а *chorda tympani* и *n. lingualis* завршавају се у близини настајућег субмандибуларног ганглиона. У овом периоду се шире површински и дубоки слојеви мезенхима другог шкржног лука и почиње интензивније формирање мишића лица (2) (Шема 1.9).



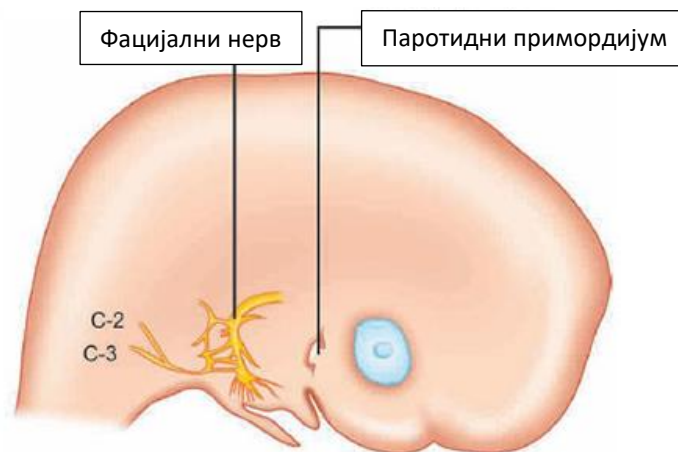
Шема 1.9. Шеста недеља ембрионалног развоја – формирање мишића лица

Почетком седме недеље јасно су видљиви *n. intermedius* (између моторног дела *n. facialis* и *n. statoacusticus*) и *n. auricularis posterior* (дистално од *chorda tympani*). *Chorda tympani* и *n. lingualis* се спајају проксимално са субмандибуларном жлездом (Шема 1.10).

Крајем седме недеље доње букалне, маргиналне мандибуларне и цервикалне гране фацијалног нерва приближавају се паротидном примордијуму, а средином девете недеље су већ унутар њега, тако да се букалне гране налазе уз главни жлездани канал.

За разлику од њих, темпоралне, зигоматичне и горње букалне гране налазе се изнад у односу на паротидни примордијум, а једна од темпоралних грана се приближава фронталном пределу ка фузионисаним очним капцима (2).

Проксималне гране фацијалног нерва (*n. auricularis posterior* и *r. digastricus*) се формирају на крају шесте недеље, а темпорофацијалне и цервикофацијалне гране се уочавају почетком осме недеље гестационог развоја, да би се на крају те осме недеље формирало пет завршних грана (*pes anserinus*) (20).



Шема 1.10. Седма и осма недеља ембрионалног развоја -- формирање грана фацијалног нерва

Током **осме** недеље почиње формирање фацијалног канала у виду жлеба на задњем делу картилагинозне отичке капсуле у којем су смештени *n. facialis*, крвни судови и *m. stapedius*. У деветој недељи се, спајањем са отичком капсулом, формира предњи зид фацијалног канала (2).

У периоду између 10. и 15. недеље код ембриона дужине 58-80 *mm* долази до израженог гранања периферних делова фацијалног нерва и формирања бројних комуникација са другим кранијалним нервима (2).

Однос између фацијалног нерва и паротидне пљувачне жлезде је исти као у седмој недељи ембрионалног развоја док се у 14. и 15. недељи диференцирају односи према структурама средњег уха (2, 20).

При рођењу, анатомија фацијалног нерва је иста као код одраслих, са површнијим варијацијама стилмастoidalног отвора, а коначан анатомски положај у адултном периоду је условљен постнаталним формирањем мастoidalног наставка (2).

Коштани канал фацијалног нерва се развија до рођења, затварајући истоимени нерв целом дужином осим у пределу коленог ганглиона, у дну средње лобањске јаме (20).

Површнији положај стилмастoidalног отвора код новорођенчади је једина анатомска разлика у односу на одрасле јединке. Са развојем мастoidalног наставка фацијални нерв се помера у инфериорнији и медијални положај све док не заузме свој коначни положај у паротидној ложи. Појављује се зачетак паротидне жлезде као евагинација бочног дела усне дупље (2).

1.5. ПАТОЛОГИЈА ДИСФУНКЦИЈЕ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Дисфункција фацијалног нерва је исцрпљујући процес који утиче на квалитет живота особе, не само кроз функционално оштећење, већ и због нарушене самоперцепције и смањеног психосоцијалног капацитета.

Због екстензивног тока и чињенице да је то нерв са најдужим кранијалним током у коштаном каналу, постоји широк дијапазон клиничких слика оштећења функције фацијалног нерва, а које се презентују од парезе до тешког облика парализе свих или појединих завршних грана нерва. Његова функција у моторичком делу покрета мимичне мускулатуре лица, утицај преко парасимпатичког и секреторног дела на пљувачне и сузне жлезде, чини срж људске комуникације и изражавања.

Етиологија дисфункције фацијалног нерва класификује се на основу узрока који је довео до ње и може се представити кроз шест категорија.

1.5.1. Идиопатска етиологија дисфункције фацијалног нерва

Белова парализа (*Bell's palsy*) је најчешћи узрок парализе фацијалног нерва, карактерише је нагли почетак са прогресивном клиничком сликом у прва три дана, често позитивном анамнезом вирусних инфекција (*herpes simplex* HSV-1, HSV-2 и *varicella zoster*) и захвата све гране паротидног плексуса. Погађа 11.5–53.3 на 100.000 појединаца годишње у различитим популацијама. До данас, већина случајева Белове парализе је откривена без утврђивања одређеног узрока. Једини широко потврђени налази су инфламација и едем фацијалног нерва који доводе до компресије истог унутар фацијалног канала (24).

1.5.2. Трауматска етиологија дисфункције фацијалног нерва

Траума је други водећи узрок оштећења фацијалног нерва, било да се ради о последицама саобраћајне трауме, повредама током физичког контакта са другом особом или јатрогеним повредама које се најчешће јављају у оквиру хируршких интервенција у пределу лица. Траума чини 6-27% свих парализа фацијалног нерва.

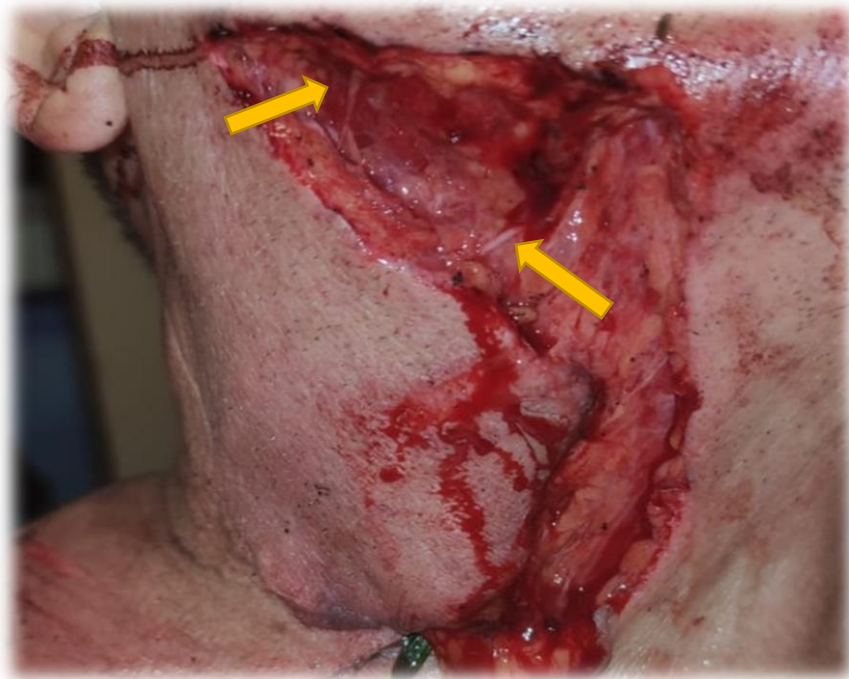
Повреде фацијалног нерва у зависности од локализације могу бити интракранијалне, интратемпоралне и екстракранијалне (25).

Преломи темпоралних костију могу бити најчешћи узрок трауматске парализе лица, а јављају се у 7 до 10% свих прелома. Услед пирамидалног облика и велике густине слепоочне кости, неопходна је значајна сила за изазивање прелома (26).

Дакле, 31% прелома темпоралне кости настаје као последица судара моторних возила. Следећи најчешћи узроци прелома темпоралне кости су напади и падови (27,28).

Сходно томе, приближно 90% прелома темпоралне кости је повезано са интракранијалним повредама, а 10% је повезано са повредама вратне кичме (29).

Нису ретке ни повреде појединих екстракранијалних грана фацијалног нерва настале у склопу саобраћајног трауматизма или задесним повредама главе и врата различите етиологије (Слике 1.4, 1.5).



Слика 1.4 Повреда маргиналне гране при задесном паду са терасе (пацијент збринут у Клиници за МФХ ВМА)



Слика 1.5 Повреде маргиналне и букалне гране као последица саобраћајног трауматизма (пацијент збринут у Клиници за МФХ ВМА)

Последица повреде је делимично или трајно оштећење нерва које резултира парезом или парализом мускулатуре лица, која се дефинише као потпуно одсуство свих вољних покрета у свим деловима инервационог подручја нерва, што доводи до тешких функционалних и естетских проблема код пацијената. Посебан вид повреде нерва је јатрогена повреда која се најчешће јавља током хируршких интервенција (операција тумора паротидне жлезде, хируршко лечење прелома кондиларног наставка доње вилице, ексцизија већих тумора коже паротидног региона, естетски захвати у подручју лица, отолошка хирургија) (25,27,30).

1.5.3. Јатрогена оштећења фацијалног нерва

Јатрогено оштећење фацијалног нерва најчешће је узроковано директним или индиректним хируршким радом. За нас су од посебног значаја јатрогене повреде транскранијалног дела фацијалног нерва, које се најчешће јављају у склопу хируршких интервенција у пределу паротидне ложе, где се сам нерв рачва на своје завршне гране које инервишу мишиће лица. На основу података из литературе, проценат јатрогених повреда фацијалног нерва у оквиру максиларнофацијалних хируршких захвата износи око 40% (30). Јатрогене повреде настају најчешће при хируршким интервенцијама уклањања тумора паротидне пљувачне жлезде и крећу се од 18-65%, што зависи од величина тумора, његове локализације и саме хируршке технике (16,31).

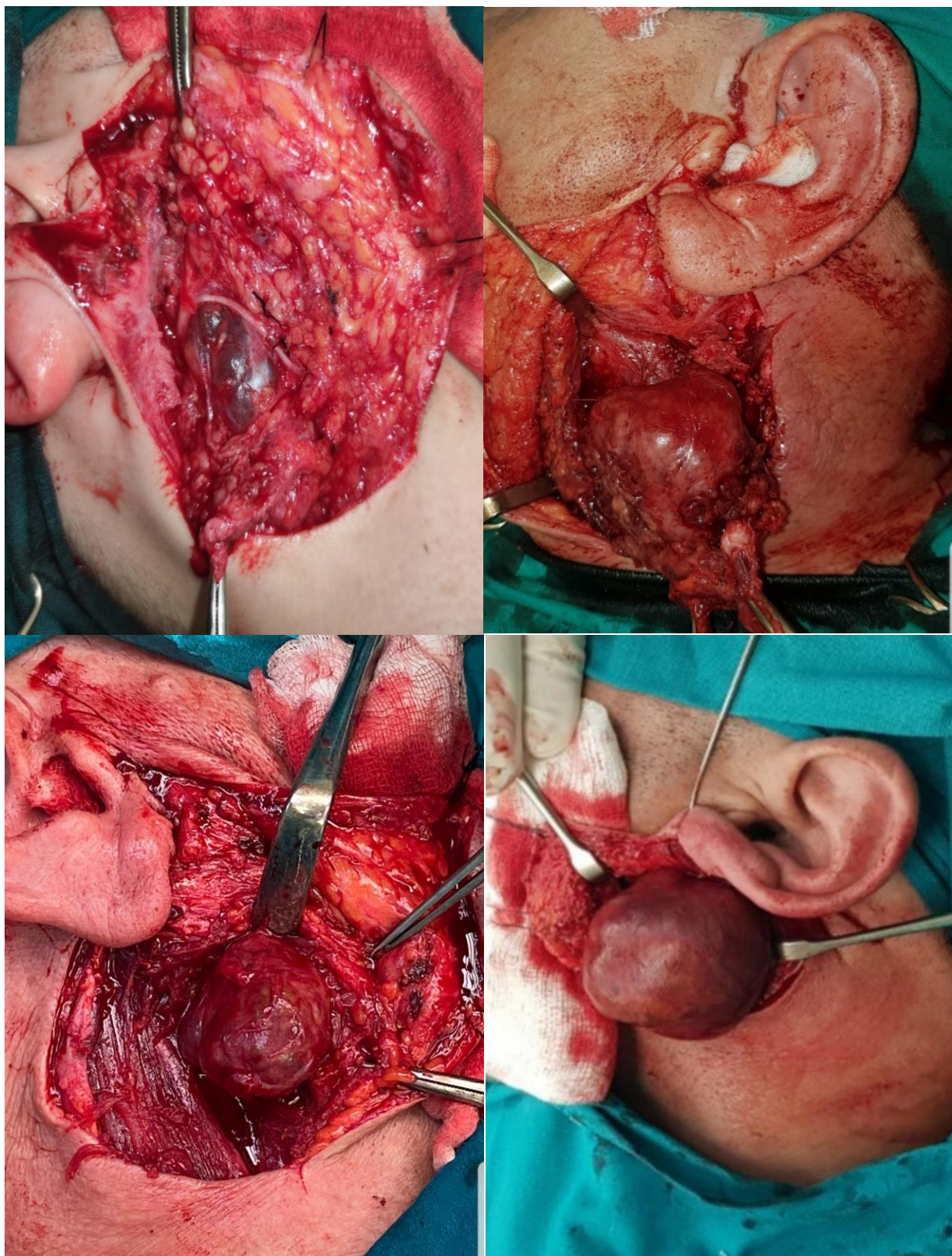
Тумори пљувачних жлезда чине 3-10% свих тумора главе и врата са најчешћом локализацијом у пределу паротидне пљувачне жлезде, учесталост се креће од 36,6 % до 83% (32).

Већина ових тумора има бенигне карактеристике и лече се искључиво хируршким путем.

Једна од најчешће описаних компликација током хируршких интервенција је привремено оштећење - пареза фацијалног нерва, која чини 18-65%, док се трајно оштећење - парализа јавља у 0-19% случајева (16).

Након тоталне паротидектомије инциденција парализе фацијалног нерва је око 40%, након суперфицијалне паротидектомије износи 28%, док је учесталост код парцијалне суперфицијалне паротидектомије око 9,6% (33) (Слика 1.6).

Јатрогене повреде могу настати и током примене локалног анестетика за *n. alveolaris inferior*, где су у литератури описани случајеви парализе 20 дана након примене анестетика (2), као и током хируршког збрињавања виличних деформитета, при лечењу повреда доње вилице и хируршким захватима у пределу лица и врата у циљу уклањања патолошких промена (тумори, цисте, инфекције).



Слика 1.6. Приказ локализације тумора у паротидној пљувачној жлезди (интраоперативне слике пацијената оперисаних у Клиници за МФХ ВМА)

1.5.4. Инфективна етиологија обољења фацијалног нерва

Парализа фацијалног нерва најчешће се јавља у склопу Рамзи-Хантовог (*Ramsey-Hunt*) синдрома који је узрокован реактивацијом вируса херпес зостер у геникулатном ганглиону. Клиничка слика је карактеристична и описује се тријадом симптома: ипсилатерална парализа, оталгија и везикуле у слушном каналу. Отолошки симптоми се манифестују у виду тинитуса, хипоакузије, нистагмуса и вртоглавице. За разлику од Рамзи-Хантовог синдрома, где су везикуле у слушном каналу један од кључних дијагностичких података код инфекције херпес зостером је одсуство везикула и блажа клиничка слика (2-35% пацијената). Пацијенти са Рамзи-Хантовим синдромом имају тежак и непотпун опоравак (34).

Мање уобичајени инфективни узроци парализе фацијалног нерва могу се јавити као део туберкулозе, полиомијелитиса код деце, инфективне моноклеозе, лепре, сифилиса и ботулизма. Парализа фацијалног нерва може бити први симптом HIV инфекције (34).

1.5.4. Неопластична етиологија дисфункције фацијалног нерва

Спора прогресија парализе која се јавља постепено без побољшања шест месеци након првих симптома указује на неопластичну етиологију. Најчешћи тумор који утиче на функцију фацијалног нерва је акустични неуриниом, а најчешћи тумор самог нерва је шваном (2,39).

Много чешће, парализа фацијалног нерва је један од првих симптома који се јавља у склопу малигних болести, посебно тумора паротидне пљувачне жлезде.

1.5.6. Конгенитални узроци парализа фацијалног нерва

1.5.6.1. Мобијусов синдром (*Möbius syndrome*)

Непрогресивно неуролошко стање које се манифестује као парализа мишића лица описано је као део Мобијусовог синдрома. Немачки неуролог *Paul Julius Möbius* је први описао овакво стање 1888. године (2).

Људи са Мобијусовим синдромом због нарушене експресије лица не могу да се смеју или мрште. Због парализе лица није могуће трептати, затварати очи а евидентан је лагофталмус. Остали симптоми Мобијусовог синдрома могу укључивати респираторне потешкоће, потешкоће у говору или гутању (због мале браде и необичног облика језика), проблеме са видом и сензорном интеграцијом, поремећаје спавања уз елементе аутистичног спектра. (Слика 1.7). Узроци су непознати, верује се да је то комбинација генетских фактора и фактора средине (33).

Преваленција Мобијусовог синдрома се процењује на једно на 250.000 живорођених са једнаком инциденцом код оба пола. Већина случајева је спорадична, али су документовани породични случајеви који представљају око 2% свих погођених појединаца. Због своје изузетне реткости, синдром се обично касно дијагностикује иако се може приметити да новорођенче плаче без икакве промена експресије лица. Конгенитална парализа VI и VII кранијалног нерава резултира парализом погледа (35).

1.5.6.2. Голденхаров синдром (*Goldenhar syndrome*)

Непотпуни ембрионални развој унутрашњег ува који резултира хипофункцијом фацијалног нерва, хипоплазијом доње вилице, аномалијама уха и ока, као и малформацијом пршљенова дефинише се као Голденхаров синдром (Слика 1.7.). Реч је о наследној болест коју је први открио *Moris Goldenhar* 1952. године (36).

Спектар абнормалности се креће од благе до тешке и обухвата пацијенте са једва приметном асиметријом лица до веома израженог дефекта лица са мање или више израженим аномалијама унутрашњих органа или скелета. Етиопатогенеза је мултифакторски условљена и зависи како од генетских, тако и од фактора средине са још увек великим непознаницама у вези са овим синдромом. Учесталост Голденхаровог синдрома је једно на 3.500-5.600 новорођенчади, однос између мушкараца и жена је 3:2 (36).

1.5.6.3. Ди Џорџов (*Di Georgeov*) синдром

Ди Џорџов синдром је комбинација знакова и симптома узрокованих дефектима у развоју структура изведених из фарингеалних лукова током ембриогенезе. Ди Џорџов синдром је урођена имунодефицијенција коју карактеришу аномалије лица, расцеп непца, парализа фацијалног нерва, урођене срчане мане, хипопаратироидизам са хипокалцемијом, когнитивни, бихејвиорални и психолошки проблеми и повећана осетљивост на инфекције.

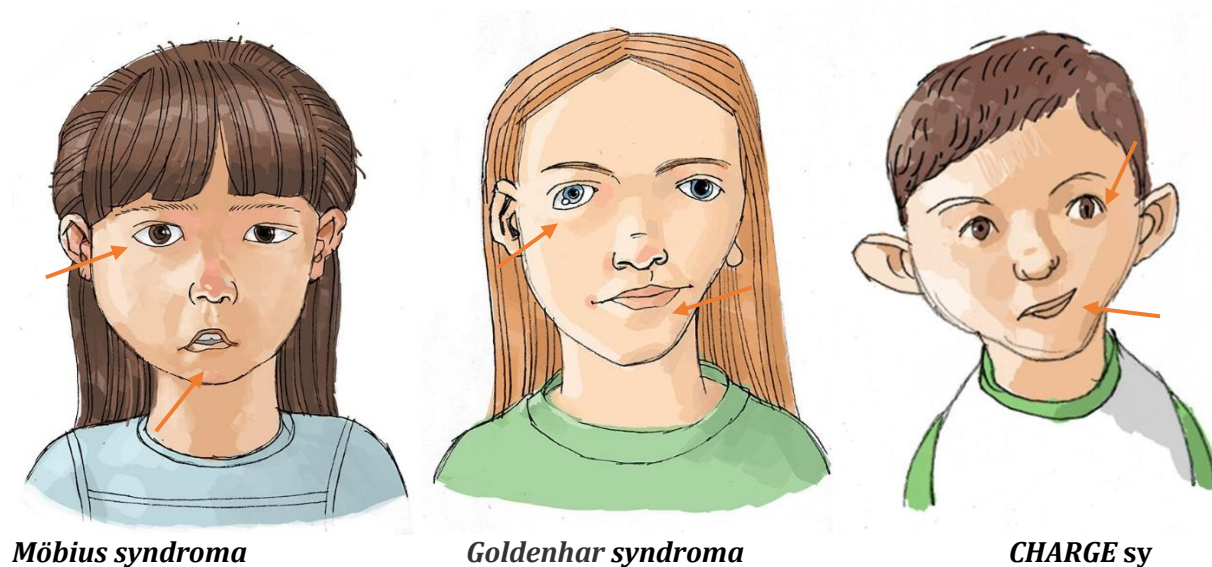
Симптоми болести први пут су описани 1828. године, али је синдром први пут у литератури презентовао *Andelo di Georgi* 1965. године. Припада групи синдрома који су под већим окриљем груписани под називом синдроми делеције хромозома 22q11. Крајем 1981. године утврђена је генетика синдрома (37).

Делеција 22. хромозома је узрок овог синдрома у 90% случајева. Најчешће се делеција јавља *де ново*, а само у 10% је наследна. Излагање алкохолу или другим токсинима, као што су ретиноиди, током интраутериног развоја може довести до ових и сличних синдрома. Ди Џорџов синдром се јавља код једног на 4.000 новорођене деце (37).

1.5.6.4. *CHARGE* синдром

CHARGE синдром је ЕНГлески акроним за симптоме : С-колобома ока; Н-дефекти срца; А-атрезија хоана; R-заостајање у расту и развоју; G-генитална хипоплазија; Е-абнормалност/глувоћа. *CHARGE* синдром је ретка аутозомно доминантна болест која се дијагностикује у пренаталном или неонаталном периоду због бројних дисморфних и конгениталних аномалија. Први га је описао *Hil-Hitner* по коме је ген једно време носио име (38).

Настаје због мутација на гену CHD 7 (*chromodomain helicase DNA binding protein*) присутног на хромозому 8q12 и доводи до структурних абнормалности које се манифестују у виду колобома, дефекта срчаних залистака, атрезије хоана, ретардације, гениталне хипоплазије и глувоће повезаних са дисфункцијама VII или VIII кранијалног нерва (Слика 1.7) (38).



Слика 1.7. Конгенитални синдроми са парализом фацијалиса – графички приказ

Узроци парализе фацијалног нерва могу бити различити, системски и метаболички поремећаји као што су дијабетес мелитус, хипертензија, амилоидоза и саркоидоза.

Неуролошки поремећаји који могу довести до дисфункције фацијалног нерва укључују *Guillian-Barreov* синдром, мијастенију гравис, мултиплу склерозу и цереброваскуларни инзулт (2).

Melkersoson-Rosenthal синдром је редак поремећај који карактерише класична клиничка слика орофацијалног едема, рагада на језику и понављајућа парализа фацијалног нерва.

Аутоимуне болести - реуматоидни артритис, *Sjögrenov* синдром, лупус и саркоидоза у одређеним стадијумима болести могу изазвати парализу фацијалног нерва (2).

1.6. КЛАСИФИКАЦИЈА ПОВРЕДА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Предмет нашег рада је лечење повре екстракранијалног дела фацијалног нерва, које су углавном јатрогене, а да би се у потпуности разумели механизми регенерације нерва потребно је обратити пажњу на класификацију повреда и утврдити степен оштећења нерва. Да би се разумео појам повреде фацијалног нерва, потребно је сагледати дешавања на нивоу нервних влакана од тренутка повређивања до тренутка утврђивања тежине повреде.

Постоје две најчешће коришћене класификације дегенерације периферног нерва на основу којих је могуће предвидети брзину спонтаног опоравка истог. Савремена класификација нервних повреда обухвата шест степени оштећења нерава и представља проширену *Seddon-Sunderlandov* класификацију, који су увели *Mackinnon* и *Dallan* 1988. године (39).

Ser Herbert Seddon (1903-1977), познати британски хирург и неуролог који је стекао репутацију својим епохалним истраживањем на нивоу хируршког лечења повреда периферних нерава током Другог светског рата, успоставио је прву класификацију 1943. године (40).

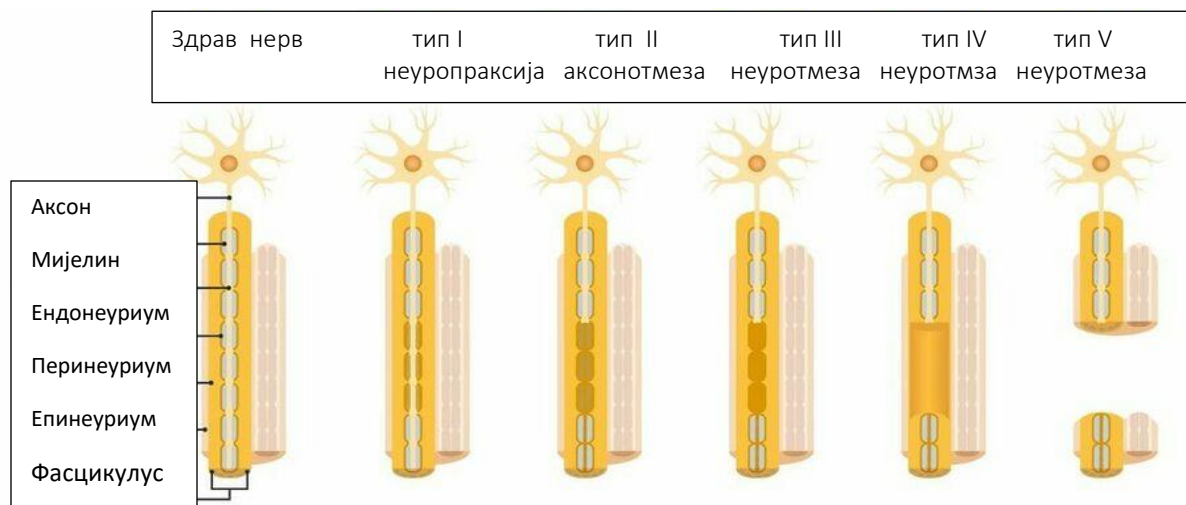
Његово запажање довело је до спознаје да аксон може одговорити на трауму на три начина и то:

Први степен - неуропраксија је физиолошки блок проводљивости узрокован најчешће тупом повредом истезањем или компресијом. То је најблажи облик повреде нерва са минималним оштећењем структуре. Код овог облика повреде фокални сегмент нерва је демијелинизован на месту повреде без оштећења аксона и узрокован је продуженом исхемијом, а пошто је аксон интактан, нема Валеријанове дегенерације. Ова врста повреде завршава се потпуним опоравком нерва (40).

Други степен - аксонотмеза подразумева прекид континуитета аксона без оштећења везивне мреже нерава (ендонеуријум, перинеуријум и епинеуријум). Иако је унутрашња структура очувана, оштећење аксона доводи до Валеријанове дегенерације. И код ове врсте повреде опоравак је сигуран, само што је време опоравка дуже него код неуропраксије (40).

Трећи степен - неуротмеза резултира лезијом аксона и потпорног везивног ткива. Ако је нерв макроскопски пресечен, на крајевима се формирају неуром и глиом - ожиљне формације које спречавају спонтану регенерацију. Код ове врсте повреде нема спонтаног опоравка, те је индикована реконструкција нерва (40).

Ser Sidni Sunderland (1910-1993) проширује Седонову класификацију у пет категорија према тежини повреде (41) (Шема 1.11).



Шема 1.11. *Seddon-Sunderland-ova* класификација - шематски приказ

Mackinnon и *Dellon* су 1988. године увели шести степен повреде нерава и дали концепт модерне класификације која представља комбинацију свих претходних. Шести степен повреде нерва карактерише постојање континуираног неуриннома који представља велики хируршки проблем, а самим тим компромитује и регенерацију (39).

Седонова класификација се у потпуности може применити на фацијални нерв, док Сандерлендова класификација није сасвим адекватна јер један део стабла фацијалног нерва (цистернални и каналикуларни) нема перинеуријум и епинеуријум (2).

Сандерлендова класификација је погоднија за акутну трауматску парализу лица, док је Седонова практичнија за акутну инфламаторну парализу лица, као што је Белова парализа. Јединствена *Seddon-Sunderland-ova* класификација указује на преклапања у класификацији повреда периферних нерава, а степен повреде је специфичан за сваког појединачног пацијента (39) (Табела 1.2).

<i>Seddon</i>	Опис повреде	Симптоми	<i>Sunderland</i>
Неуропраксија	Најблажи облик повреде нерва са минималним оштећењем структуре. Фокални сегмент нерва је демиелинизован на месту повреде без прекида аксона, нема Валеријанове дегенерације. Кратак и потпун опоравак	- Бол - Утрнулост - Слабост мишића	I степен
Аксонотмеза	Оштећење аксона и мијелинске овојнице (ендонеуријум, перинеуријум и епинеуријум) нетакнути. Оштећење аксона доводи до Валеријанове дегенерације. Опоравак је потпун, али дужи него код неуропраксије.	- Бол - Губитак мишићне масе - Потпуни губитак моторичке, сензорне и симпатичке функције	II и III степен
Неуротмеза	III степен – повреда аксона и ендонеуријума, перинеуријум и епинеуријум интактни IV степен - повреда аксона и перинеуријума V степен – потпуно оштећење стабла	- Без бола - Губитак мишићне масе - Губитак моторичке, сензорне и симпатичке функције	III, IV и V степен

Табела 1.2 *Seddon-Sunderland – ova* класификација – опис повреде и клиничка слика

Када је у питању клиничка опсервација на основу које се процењује степен дисфункције фацијалног нерва, користи се стандардизована *House Brackmannova* скала, која се заснива на функционалним оштећењима у распону од нормалног стања до потпуне фацијалне парализе. Први пут је употребљена 1985. године, а описана је у литератури од стране *John W. House* и *Derald E. Brackmann*, оториноларинголога из Лос Анђелеса (42) (Табела 1.3).

Поменута скала се првенствено користи у сврху прогнозе лечења дисфункције фацијалног нерва, а као таква се упркос одређеним недостацима користи и данас, уз корекцију истих и допуњава се новим системима за процену функције фацијалног нерва (43).

Степен	Опис	Карактеристике
I	нормалан	нормална функција мишића
II	Лака дисфункција	Мала слабост приметна при пажљивој инспекцији може имати врло благу синкинезу
III	Умерена дисфункција	Очигледна, недеформишућа разлика између две стране је приметна, али није јака, синкинезије, контрактуре, хемифацијални спазам, потпуно затварање ока
IV	Умерено тешка дисфункција	Очигледна слабост – асиметрија, у мировању - нормална симетрија, непотпуно затварање очију, чело - без покрета, уста - асиметрична
V	Тешка дисфункција	Једва приметно кретање, асиметрија у мировању, непотпуно затварање очију, чело - нема покрета, уста - благо кретање
VI	Тотална парализа	Нема кретања

Табела 1. 3 Систем за процену функције фацијалног нерва *House Brackmann*

1.7. ПАТОФИЗИОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА НАКОН ПОВРЕДЕ

После повреде фацијалног нерва, патофизиолошке промене зависе од тежине повреде, као и од близине повређеног сегмента телу Шванове ћелије. Након блаже повреде, као што је неуропраксија долази до фокалне демиелинизације и ремиелинизације (44) .

Код тежих повреда долази до ретроградне дегенерације и регенерације аксона проксимално и дистално од места лезије, дистални део подлеже Валеријановој дегенерацији, а проксимални део ретроградним дегенеративним променама стимулишући процес регенерације (45).

1.7.1. Валеријанова дегенерација

Augustus Volney Waller (1816-1870) Енглески физиолог, је 1850. године спровео експеримент на жабама где је пресецањем глосифарингеуса и хипоглосуса доказао да је дистални сегмент нерва подложен дегенерацији, што је прихваћено у научној литератури под епонимом Валеријанова дегенерација (2).

Валеријанова дегенерација се може дефинисати као организовани имуни одговор повређеног периферног нерва на трауму (регрутовање макрофага, фагоцитоза дегенерисаног мијелина и производња цитокина и хемокина) (44).

Пре него што дође до регенерације нерва, мора се десити низ дегенеративних промена. Трансекција аксона дели нерв на проксимални сегмент који је повезан са телом ћелије и дистални сегмент. Неколико минута након трансекције нерва, два сегмента се повлаче у супротним смеровима од места повреде до нивоа првог Ренвијевог нодуса, влакно постаје едематозно са проширеним *Schmidt-Lantermanovim* инцизурама и почетном разградњом мијелина (2,44).

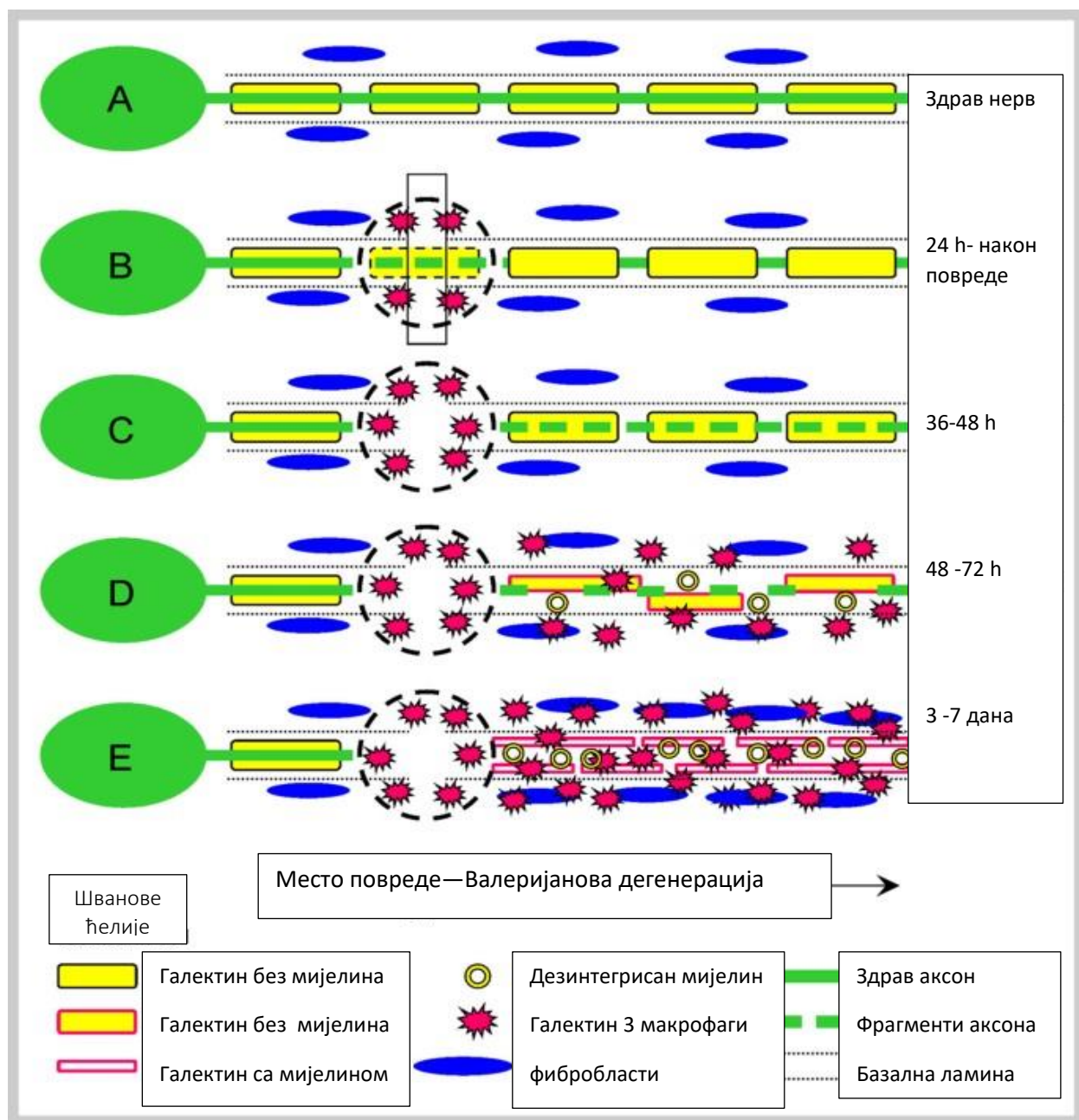
Дегенерација проксималног сегмента периферних моторних нерва је ограниченог карактера, односно протеже се до првог Ренвијевог нодуса док се у дисталном сегменту одиграва Валеријанова дегенерација. За фацијални нерв је карактеристично да се проксимална ретроградна дегенерација шири много даље од првог Ренвијевог нодуса, а Валеријанова дегенерација не напредује подједнако у свим влакнима. У прва 24 сата након повреде једро Шванове ћелије мигрира ка периферији, ћелија губи ендоплазматски ретикулум и долази до хроматолизе. Хроматолиза се завршава између 10. и 21. дана након повреде (44).

У року од 24 сата након повреде долази до Валеријанове дегенерације, на месту повреде нерва долази до акумулирања галектин-3 макрофага који имају проинфламаторни ефекат подстичући процес фагоцитозе да би у наредних 36 сати дошло до деструкције аксона што условљава и прекид нервне проводљивост. Дезинтеграција мијелина дешава се 48 сати након повреде уз експресију галектин-3 макрофага. За четири дана масне мијелинске капљице из цитоплазме Шванових ћелија прелазе у ендонеурални простор где се подвргавају процесу фагоцитозе хематогеним макрофагима, процес фагоцитозе се завршава у периоду од 12. до 14. дана након повреде (44).

Потпуна дегенерација настаје до 14. дана након повреде, Валеријанова дегенерација може бити дужине и до 3cm (2).

До краја треће недеље Шванове ћелије пролиферирају у облику уздужних ланаца унутар базалне мембране дисталног краја аксона, премашћујући дефект бројним ћелијским тракама Бингерове (*Büngner*) траке, које имају важну механичку и метаболичку улогу у процесу регенерације нерва. Такође је потребно напоменути, да се у току процеса дегенерације умножавају фибробласти пореколом из ендонеуријума, перинеуријума и епинеуријума. Дакле, процесом дегенерације формира се празан ендонеурални тубус који се састоји од ендонеуријума, базалне ламине и Шванових ћелија (2,44).

Између 4. и 20. дана након повреде формирају се органеле за синтезу протеина неопходних за регенерацију аксона, а 21. дана су оспособљени за регенерацију неурон и дистални део ледираног аксона. Метаболите, који су неопходни за процес регенерације обезбеђују и околна ткива (44) (Шема 1.12).



Шема 1.12. Валеријанова дегенерација – шематски приказ

Нетакнут (А) и повређен нерв (В, С, D, Е) кроз процес Валеријанове дегенерације

А-Интактне Шванове ћелије обавијају аксон, фибробласти су распоређени између нервних влакана
В-траума доводи до оштећења ткива (круг), формира се јаз између проксималне и дисталне ивице (правоугаоник), галектин-3⁺ макрофаги се акумулирају у року од 24 сата од повреде

С - деструкција аксона током Валеријанове дегенерације 36 сати након повреде

Д - регрутовање галектина-3 макрофага, дезинтеграција мијелина, експресија галектина-3⁺ у Швановим ћелијама почиње 48-72 сата након повреде током дегенерације

Е - галектин-3 макрофаги и Шванове ћелије фагоцитирају дегенерисани мијелин током Валеријанове дегенерације, Шванове ћелије се размножавају и формирају Бингерове траке.

Након повреде нерва долази до промене у експресији гена који кодирају протеине, а који активирају регенеративни одговор у неуронима. Ово доводи до промена у синтези молекула укључујући неуротрансмитере и ћелијске протеине, неуропептиде и цитокине у фацијалним једрима. Такође се смањује експресија холин ацетилтрансферазе која је пропорционална функцији моторног неурона у фацијалном моторном једру можданог стабла. То значи да повреда фацијалног нерва покреће низ догађаја у централном нервном систему укључујући промене у ослобађању неуротрансмитера, глијалну активацију и промене у експресији гена које могу допринети функционалној и структурној реорганизацији (44) .

Неуротрофни фактори раста који промовишу процес неурорегенерације називају се неуротрофини, а изоловао их је *Cohen* 1959. године. Доказани фактори раста који утичу на регенерацију нерва су: “*nerve growth factor*“, “*fibroblast growth factor*“, “*insulin-like growth factor*“, “*ciliary neurotrophic factor*“ (45).

Неуротрофини се првенствено секретују из циљног ткива или периферних циљних ткива и делују тако да спрече програмирану ћелијску смрт околних неурона чији аксони инервишу циљно ткиво, а чиме се промовише њихов опстанак. Ови фактори не само да регулишу број неурона утичући на опстанак диференцираних неурона, већ утичу и на преживљавање, диференцијацију и пролиферацију неуронских прекурсора током раног развоја, као и у адултном периоду живота (45).

Експресија NGF се повећава за пет до седам пута у периоду до 14. дана након повреде нерва, при чему кључну улогу у њиховој експресији имају Шванове ћелије и нервни фибробласти. Симултано дејство фактора раста ствара повољно окружење за неурорегенерацију. Њихово лучење је најизраженије када су крајеви пресеченог нерва раздвојени за око 5 *mm*, а код дистанце мање од 2 *mm* њихово лучење је занемарљиво (45).

Регенерација нерва почиње 24 сата након повреде, када су у питању теже повреде, иста почиње након Валеријанове дегенерације, односно регенерација прати дегенерацију нерва. Регенерација фацијалног нерва је процес раста аксона проксималног сегмента кроз дистални ендонеурални тубус који формирају Шванове ћелије. Функционални ефекат регенерације зависи од броја влакана која достижу циљни орган и успостављају везу са њим (45).

Због честог гранања, број аксона у дисталном сегменту је већи од нормалног (130%), независно од примењене технике регенерације, најдебља и најбржа влакна се никада не регенеришу у потпуности, зато што интернодална дистанца остаје мала (до 200 μ) а дебелина мијелина никада не достиже регуларне вредности (2).

Раст аксона може да успори фиброзно ткиво, а регенерисани нерв са мијелинском овојницом може да постане неуром. Ако један аксон уђе у ендонеуријум другог аксона, долази до тзв. „једноставног погрешног усмерења“, али ако више аксона уђе у ендонеуријум других аксона, долази до „комплексног погрешног усмерења“. Клинички примери ових феномена су дијагностиковани као синкинезије (44).

Регенеришући аксон улази у дистални сегмент две недеље након аксонотмезе и четири недеље након неурсутуре. Латентни период је узрокован ретроградном пароксизмалном дегенерацијом (Валеријанова дегенерација) (2).

Регенерација напредује у просеку за 1 *mm* дневно, брже након проксималних (3 *mm*) него након дисталних (0,5 *mm*) лезија и потребно је неколико недеља или месеци за сазревање аксона у пределу таргет органа (мишића). Опоравак денервисаних мишића обезбеђује се колатералним огранцима очуваних аксона који преузимају инервацију мишићних влакана 4-20 пута више него у физиолошким условима. Очекујемо добар функционални опоравак ако је број очуваних аксона између 10-20% (2).

На основу изнетих података који указују на значајан неуротрофни ефекат фактора раста (45), поставља се питање убрзане регенерације фацијалног нерва пласирањем веће количине фактора раста добијених из аутологних тромбоцита на место настале повреде, што је подстакло посебно интересовање за настанак овог рада.

1.8. ХИРУРШКО ЛЕЧЕЊЕ ПОВРЕДА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Избор хируршких метода лечења зависи од висине лезије нерва, времена протеклог од повреде, интегритета дисталног и проксималног сегмената, величине дефекта, удружених болести и старости пацијента. У току хируршког збрињавања нерв мора бити приказан проксимално и дистално од места повреде (2).

Индикације за хируршко лечење повређеног фацијалног нерва су:

- Затворене повреде без функционалног опоравка и после три месеца од повреде (три месеца је горња граница спонтаног опоравка лезија од I до III степена);
- Отворене повреде са јасном трансекцијом нерва;
- Интраоперативне јатрогене повреде;
- Функционални дефицит услед компресије ожиљног ткива.

С обзиром, да је акценат у овом раду био на повредама екстракранијалног дела фацијалног нерва, односно његовог паротидног плексуса, детаљније ћемо се позабавити хируршким третманом повреда завршних грана фацијалног нерва.

Хируршке технике које се користе и зависе од степена оштећења нерава су:

- Екстерна неуролиза;
- Унутрашња (интерфасцикуларна неуролиза);
- Директна сутура ("end to end");
- Трансплантација нерва.

Екстерна неуролиза представља препарацију нервног стабла са одвајањем целе циркумференције нерва од околног ожиљног ткива и дела измењеног епинеуријума. Припрема се увек изводи проксимално и дистално од места лезије. Екстерна неуролиза представља први део хируршког лечења, односно ако је нерв анатомски очуван хируршко лечење се завршава спољашњом неуроллизом (2,25).

Интрафасцикуларна неуролиза подразумева уклањање фасцикуларних група унутар ледираног сегмента нерва.

Уклањањем задебљалог перинеуријума постиже се декомпресија интактних нервних влакана и омогућава спонтану регенерацију, неуролизу треба ограничити само на ледирани део нерва како би се избегло оштећење васкуларне мреже и спречио могући неуролошки дефицит. Неуролиза смањује инфламацију у пределу оштећеног нерва (25).

Оперативно лечење ледираног фацијалног нерва може се спроводити у различитим периодима које диктирају време и околности повреде.

Примарна неурорафија се изводи непосредно након повреде изазване оштрим предметом (нож, стакло) најчешће након јатрогених повреда и временски је ограничена на период до 72. сата, тако да процес Валеријанове дегенерације још није завршен. Погодна је због лаке идентификације и минималне ретракције проксималног и дисталног сегмента нерва чиме се добија време потребно за благовремену неурорегенерацију (25).

Сегментна ресекција нерва се такође препоручује када је више од 50% пречника нерва повређено што би вероватно резултирало великим ожиљцима (25).

Уколико се неурорафија не спроведе у оптималном року, следећи терапијски поступак подразумева касну секундарну неурорафију у периоду између трећег и четвртог месеца, а закључно са шестим месецом, из разлога што моторне плоче постају резистентне на реинервацију после два месеца док се ендонеурални тубуси сужавају на 50% после шест месеци (2).

Директна сатура подразумева директну коаптацију нервних крајака. Ова процедура обично се примењује код нервних лезија у дисконтинуитету, при чему је дефект нервне супстанце мали, па се нервни крајци могу међусобно спојити без тензије на сатурној линији.

Директна сатура фацијалног нерва врши се према принципима директне нервне репарације, а која се састоји се од два постулата: препарација и апроксимација.

Препарација се састоји у уклањању дела епинеуријума и ослобађању фасцикулуса. У случају детекције неурома, исти је потребно одстранити у пресецима од 1-2 mm до појаве здравог ткива (дифузно крварење, здрави фасцикулуси) уз адекватну хемостазу на нервним завршецима.

Апроксимација нервних завршетака је процес њиховог спајања под минималном тензијом.

Директна неуросуатура се у зависности од података из литературе може извести код дефекта фацијалног нерва од 0,6 cm (25), до 2,5 cm (2). Код директне неуросутуре се најчешће користи епинеурални или перинеурални шав. И једна и друга метода има својих предности и мана (25).

Пре епинеуралног шав, епинеуријум се ресецира најмање 5 mm од места повреде. Анатомске лезије фацијалног нерва се јављају након истезања од 20-50%, а хистолошке промене се евидентирају при истезању од 4-11%. При покрету врата нерв се физиолошки растеже до 10-15%, а то значи да минимална напетост на месту шав, може да угрози функцију нерва. Код елонгације од 5-10% проток у венулама је смањен те долази до микроемболије и васкуларне инсуфицијенције у функцији времена (2).

Када је васкуларизација нерва већ угрожена траумом, доња граница истезања је нижа (5-10%), горња граница (11-18%) изазива иреверзибилну лезију комплетне циркулације са раздвајањем сегмената нерва на месту сутуре (2).

У идеалном случају, нервни окрајци треба да су спојени тако да се само додирују без тензије док се 3 до 4 шави постављају испрекидано у епинеуријуму (25).

Циљ неурорафије је да се повреда V класе преведе у IV класу (Sanderlend) што условљава бољу прогнозу у процесу опоравка нерва (25).

После директне репарације фацијалног нерва очекује се регенеративни потенцијал од 65-92% (2).

Спознаја о значају тензије на месту шави која угрожава перфузију, што заузврат компромитује зарастање и каснији функционални опоравак нерава поставља се питање ограничене примене директног шави и евентуалне употребе нервних графтова.

Улогу неурографта могу имати: *n. suralis*; *n. auricularis magnus*; *n. radialis*; *r. colli n. facialis* (2,25).

При употреби сензитивних нерава као нервних графтова, потребно их је ротирати за 180 степени и потом директно ушити. Графт увек мора бити 10-20% дужи од дужине дефекта, постављен обрнуто у односу на његову проксимално-дисталну оријентацију, да би се смањио губитак регенерирајућих аксона. Свака неурорафија повећава губитак аксона до 50%, што значи да две неурорафије које се користе за повезивање графта са крајевима повређеног нерва могу резултирати губитком преко 75% новонасталих аксона (25).

Основа успешне неуросутуре је минимална напетост шавова и прецизно повезивање моторног и сензорног дела нерва. У случају неслагања сензорних и моторних аксона може доћи до атрофије мишића услед денервације (45).

Како је веома тешко обезбедити правилан раст аксона без губитака који су евидентни након директне сутуре, посебно када постоји тензија као и при примени аутографта, најновија експериментална истраживања су показала да је код дефеката већих од 6 mm пожељно поставити интерпозициони графт ("*kabl graft*") који омогућава несметан раст аксона без напетости, односно ублажава погрешно усмерен раст аксона (25,46).

Дефицит у донорској регији, као и ограничене могућности аутологне трансплантације нерава потиснуле су ову методу у корист ксенографта што потврђују и најновија експериментална истраживања. Ксенографтови имају одређена ограничења у погледу имунолошког одбацивања изазваног антигенима донора. Да би се спречила поменута компликација, користе се две методе: лечење имуносупресивима или обрада нерва пре трансплантације (47).

Након репарације фацијалног нерва у процесу реинервације описани су интересантни феномени попут „крокодилских суза“ и густативне хиперхидрозе.

Феномен „крокодилских суза“ карактерише појачано лучење суза током узимања хране због погрешног усмеравања влакана ка сузној уместо ка пљувачним жлездама.

Густативну хиперхидрозу описујемо као профузно знојење током узимања хране у пределу лица или врата. Последица ове појаве су текоће погрешно усмерена регенеришућа влакна фацијалног нерва (2).

У последњој деценији праву експанзију у погледу експерименталних студија доживели су биолошки материјали који су показали висок степен неурорегенерације и ангиогенезе уз пролиферацију Шванових ћелија у процесу репарације повређеног фацијалног нерва. Биолошки материјали (фактори раста) се доминантно ослобађају из тромбоцита и као такви пласирају на место повређеног нерва уз потпору сутуром или биоматеријалима.

1.9. БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛИ У РЕГЕНЕРАЦИЈИ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

1.9.1. Фактори раста- плазма богата тромбоцитима

Термин "плазма богата тромбоцитима" (*platelet-rich plasma* – PRP) први пут је употребио 1954. године *Kingsley*, а односила се на стандардни концентрат тромбоцита за трансфузију. Током шездесетих година појавили су се први PRP препарати банке крви који су постали популарни седамдесетих година (48).

Претпостављало се, да су фактори раста једињења PRP која се лучше из тромбоцита и учествују у њиховој активацији у циљу опоравка оштећеног ткива. Ова хипотеза је касније и потврђена. *EGF* је открио *Cohen* 1962 године, а у наредним годинама изоловани су *PDGF* 1974. године и *VEGF* 1989. године (48).

Напредак у медицини генерално је довео до брзог напретка у развоју ткивног инжењеринга, а самим тим и биолошких материјала у оквиру којих посебно место заузима и PRP. Први пут 1972. године, *Matras* је користио тромбоците у облику лепка за успостављање хемостазе током хируршких захвата. *Oon* и *Hobbs* 1975. године први пут користе PRP у реконструктивној хирургији док *Ferrari* 1987. године употребљава плазму богату тромбоцитима у хирургији срца, као аутологни извор трансфузије чиме је смањен интраоперативни губитак крви, регулисан хематолошки поремећај периферне плућне циркулације и накнадна употреба крвних продуката.

Први описани протоколи примене концентрата тромбоцита названи аутологним факторима зарастања рана добијеним од тромбоцита написани су од стране *Knightona* и као такви прихваћени 1986. године. Од формулисања протокола ове технике PRP се све више примењују у естетској медицини, а од касних осамдесетих и у регенеративној медицини (48).

Осим опште и кардиохирургије, максилофацијална хирургија је још једна област у којој је PRP постао популаран почетком деведесетих година, када је први пут примењен у циљу побољшања инкорпорација коштаног трансплантата у реконструкцији мандибуле.

Плазма богата тромбоцитима се састоји од аутогених концентрованих хуманих тромбоцита у малој запремини плазме. Њихов број у периферној крви износи $150-300 \times 10^9/l$, односно око 150-300.000 по милилитру кубном крви. Величина им се креће од два до четири микрометра, најмање су ћелије у крви. Настају у костној сржи, као зрели елементи се налазе у периферној крви и у њој им је животни век око десет дана.

Тромбоцити су први тип ћелија који стижу на место повреде ткива и посебно су активни у раним инфламаторним фазама процеса зарастања, имају важну улогу у хемостазу. Адхезијом за зид повређеног крвног суда и даље кроз фазе активације и агрегације воде ка формирању крвног угрушка. Тромбоцити садрже две врсте секреторних гранула (алфа α -грануле и делта-тамне грануле) и лизозиме, који су одговорни за функцију тромбоцита. У сваком тромбоциту има отприлике 50-80 наведених гранула.

Тромбоцити су природни депозити бројних фактора раста, који се ослобађају из α -гранула у облику фундаменталних протеина: три изомера фактора раста који потичу из тромбоцита *PDGF* $\alpha\alpha$, *PDGF* $\beta\beta$ и *PDGF* $\alpha\beta$, два трансформишућа фактора раста β *TGF* $\beta 1$ и *TGF* $\beta 2$, *VEGF*, *FGF* и *EGF* (Табела 1.4) (49).

Тромбоцитни фактор раста (*PDGF*), је високо базични димерички гликопротеин од 30 kD, који се састоји од три подјединице везане дисулфидним везама, те постоји у облику хомодимера: *PDGF-AA*, *PDGF-BB*, *PDGF-CC* или хетеродимера *PDGF-AB*. *PDGF* има значајну улогу у ембрионалном развоју многих ткива и органа, укључен је у раст и развој централног нервног система, миобласта, олигодендроцитних ћелија, мезангијалних ћелија бубрежних гломерула и миоепителијалних ћелија крвних судова. Стимулише специфичне циљане ћелије везивањем на трансмембранске рецепторе активношћу тирозин киназе, при чему се активира каскада догађаја који воде ка ћелијској пролиферацији. Стимулише митогенезу матичних ћелија косне сржи, продукцију фибробласта и колагена типа 1, поспешује ангиогенезу и митозу ендотелних ћелија. *PDGF* је активан у инфламаторној фази оштећења ткива, која настаје након прве фазе у којој под дејством макрофага долази до дебридмана патолошког агенса и оштећених ћелијских делова ткива (49).

Трансформишући фактор раста (*TGF β s*), спада међу најраспрострањеније цитокине са значајном улогом у формирању и развоју многих ткива. Припада суперфамилији фактора раста укључујући и коштане морфогене протеине (*BMPs*). *TGF β s* су неопходни за нормални ембрионални развој, губитак активности води ка порасту перинаталног морталитета. *TGF- β* је хеомостатски и митогени фактор, који привлачи недиференциране ћелије на место зарастања и потстиче њихову пролиферацију и диференцијацију у фибробласте, хондробласте и остеобласте, има водећу улогу у регулацији неуроналне диференцијације и значајан је за развој нервног система. Као мултифункционални цитокини регулишу раст, пролиферацију, адхезију и апоптозу различитих ћелијских типова. *TGF- β* стимулише ангиогенезу и хондрогенезу, производњу фибронектина, гликозаминогљукана и колагена у везивном ткиву. Поред тога, инхибира ширење лимфоцита и потискује ефекте интерлеукин-1 чиме редукује инфламацију у ткиву. Стимулише моноците да луче *FGF*, *PDGF*, и *TNF – α* , активан је у фази инфламације ткива (49).

Васкуларни ендотелни фактор раста (*VEGF*), припада фамилији васкулоендотелних протеина која обухвата више гликопротеина међусобно сличне грађе, а приписује им се посебно значајна улога у ангиогенези током репродуктивног раздобља и васкулогенези у току живота. Најзначајнија особина *VEGF* у односу на све друге чланове исте фамилије је појачана продукција стварања у условима хипоксије, при чему их нормоксија врло брзо ензимски разграђује, а хипоксија стабилизује и пролонгира активност. Про – ангиогени ефекат *VEGF* повезан је са присуством рецептора за овај фактор. *VEGF* се везује за рецепторе тирозин-киназе, *Flt-1* (*VEGF* рецептор 1) и *Flk-1* (*VEGF* рецептор 2), који су присутни на ендотелу макрофага, моноцита и неких туморских ћелија. Активација *VEGF* је модулирана од стране ангиопоетин-1 (*Ang-1*), који се везује за рецептор тирозин киназе (*Tie-2*). Показало се да стимулише формирање васкуларног пупољка и одржава опстанак ендотелних ћелија. Активацијом *Ang-1* мезенхималне ћелије, које окружују ендотел узрокују производњу многобројнијих капиlara. Ендотелне ћелије показује ограничени потенцијал раста у недостатку стимулације *VEGF*. Овај фактор је заступљен у максималној концентрацији у току фазе регенерације ткива. (49).

Фибробластни фактор раста (*FBF*), највише утицаја има на мекоткивну регенерацију ткива. Фибробласти и фиброцити имају важну улогу у реконструкцији ткива, заменом старог колагена типа 3 с колагеном типа 1 и умрежавањем колагених молекула, чиме поспјешују и убрзавају зарастање, те утичу на формирање ожиљка. Његова активација зависи од интеракција са хепаринсулфат-протеогликаном (*HSPGs*) и трансмембранозних рецептора тирозин киназе *FGFR* (*FGFR-1,FGFR-2,FGFR-3,FGFR-4*), чиме се стимулише ендотелна пролиферација која условљава ангиогенезу (49).

Епидермални фактор раста (*EGF*), има митогени и хемотактички ефекат на фибробласте и епителне ћелије. Описан је као индуктор за миграцију ћелија и стимулатор за формирање гранулационог ткива. Рецептори за активацију *EGF* су углавном фибробласти, пре-остеобласти и пре-хондроцити, што указује на учешће овог фактора раста у физиолошким процесима повезаним са тим ћелијама (49).

Фактори раста, њихова функција и фазе у којима делују након повреде ткива приказани су у Табели 1.4.

Фактори раста	Функција фактора раста	Фазе
<i>PDGF</i> - тромбоцитни фактор раста	стимулише продукцију фибробласта, стимулативно делује на TGF стимулише производњу колагена, регулише синтезу протеогликана	инфламација
<i>TGF-β1</i> - трансформишући фактор раста	модулира пролиферацију фибробласта формира екстрацелуларни матрикс потискује ефекте <i>IL1</i> на синтезу протеогликана стимулише производњу колагена из фибробласта	инфламација
<i>VEGF</i> - васкуларни ендотелни фактор раста	промовише ангиогенезу промовише раст аксона има неуропротективно дејство	регенерација
<i>FGF</i> -фибробластни фактор раста	стимулише ангиогенезу и синтезу колагена подстиче пролиферацију миобласта делује неуротропно на Шванове ћелије	регенерација
<i>EGF</i> - епидермални фактор раста	промовише диференцијацију ћелија пролиферацију мезенхималних и епителних ћелија	регенерација

Табела 1.4. Фактора раста и њихова функција

Дегранулацијом α-гранула тромбоцита ослобођени фактори раста подстичу репарацију ткива, утичу на реактивност крвних судова и крвних ћелија укључених у процесу инфламације и ангиогенезе. Поред фактора раста дегранулацијом α-гранула тромбоцита ослобађају се ADP, АТР, јони калцијума, хистамин, серотонин и допамин, који су активни у модулацији и регенерацији ткива, модификујући перичелуларно окружење.

Дегранулација тромбоцита почиње у року од десет минута од контакта са базалном мембраном или под дејством фактора коагулационе каскаде. Више од 95% фактора раста се ослобађа у току првог сата након дегранулације тромбоцита, њихово лучење из плазме богате тромбоцитима активираних калцијумовим јонима наставља се наредних 3. до 5. дана, а континуирано ослобађање се дешава током животног века тромбоцита (10. дана) при чему остају активни до десет дана (49).

Тачан механизам дејства PRP-а у регенерацији периферних нерава се још увек детаљно проучава. Засигурно се зна да фактори раста ослобођени из PRP регулишу инфламаторни одговор након повреде, подстичу агрегацију макрофага, појађавају фагоцитозу чиме стимулишу почетак репарације и регенерације ткива, подстичу процес ангиогенезе, условљавају пролиферацију Шванових ћелија а самим тим стимулишу регенерацију аксона (49,50).

Након повреде периферног нерва, фибробласти, макрофаги, тромбоцити и леукоцити стварају микроокружење неопходно за почетак неурорегенерације инфилтришући простор између два сегмента повређеног нерва са тенденцијом стварања фибринске мреже. Макрофаги чине највећи део ове ћелијске популације, док васкуларне ендотелне ћелије су заступљене у знатно мањем проценту. Макрофаги се деле на два фенотипа, класично активирани проинфламаторни M1 и селективно активирани антиинфламаторни M2, који експримирају аргиназу тип 1, потстичу лучење цитокина, супримирају имуни одговор ткива и имају критичну улогу у његовом обнављању. Повреде нерва у раној фази карактерише присуство M1 макрофага, који фагоцитирају делове мијелинске овојнице и остале ћелијске продукте након дезинтеграције аксона.

Главни фактор који ослобађају макрофаги је *VEGF*. У хипоксичној средини, макрофаги се прилагођују микроокружењу тако што продукују *VEGF-A*, који у условима хипоксије везује се за трансмембранске рецепторе ендотелних ћелија који активирају доминантни интрацитоплазматични сигнал преносним протеинима ка једру откључавајући специфичне делове гена, који регулишу ћелијске функције, стимулише ангиогенезу и утиче на формирање крвних судова. Периферне нервне ћелије такође брзо реагују након повреде, мигрирајући из проксималних и дисталних сегмената нерва ка интернеуралном простору. Шванове ћелије подстичу регрутацију макрофага ослобађањем моноцитног хемоатрактантног протеина 1 (*MCP-1*) и интерлеукина 6 (инхибиторног фактора леукемије *-LIF*), који привлаче моноците на место инфламације, долази до ослобађања проинфламаторних цитокина и неуротрофних фактора (*NGF*, *BDNF* и *FGF*). Продужеци Шванових ћелија и фибробласти путем фибринске мреже формирају кружне канале, такозване Бингерове траке за контролу миграције нервних фибробласта и ендотелних ћелија док се број инфламаторних ћелија постепено смањује у функцији времена (50)

Ослобађање *VEGF* од стране макрофага промовише формирање нових крвних судова на оба сегмента нерва. Неоваскуларизација условљава миграцију Шванових ћелија дуж крвних судова, које индукују кључни сигнал за регенерацију аксона преко екстрацелуларног протеина *Netrin-1*, који се везује за *DCC (Deleted in Colorectal Cancer)* рецепторе на аксонима. *Netrin-1* има снажну хемотропну функцију за аксонско вођење, миграцију ћелија, морфогенезу и ангиогенезу. Временом фибринска мрежа се замењује регенерисаним аксонима који се формирају на месту Бингерових трака (50)

Истовремено интактне Шванове ћелије продукују нервни фактор раста (*NGF*), неуротрофни фактор из мозга (*BDNF*) и цилијарни неуротрофни фактор (*CNTF*), који стимулишу даљу пролиферацију Шванових ћелија. Фактори раста својим дејством учествују у завршној фази регенерације нерва подстичући низом механизма пролиферацију ендотелних ћелија и раст аксона уз неуропротективно дејство (50).

PRP се у регенеративне сврхе може користити сам или у комбинацији са фибринским лепком, матичним ћелијама или изолованим факторима раста као што су :

- ✚ *NGF* - протеин сличан инсулину који регулише раст, развој и одржавање симпатичких и ембрионалних сензорних неурона. Налази се у различитим количинама у отрову свих тестираних змија и у субмандибуларној пљувачној жлезди мужјака миша.
 - ✚ *FGF* - представља велику групу малих полипептидних фактора раста, утиче на пролиферацију и преживљавање ћелија, хемотаксију, миграцију и ћелијску адхезију.
 - ✚ *TGF* - има суштинску улогу у ембриогенези, посебно током периода морфогенезе.
 - ✚ *IGF* - један од главних фактора раста и диференцијације ћелија. Има анаболичко, антиоксидативно, антиинфламаторно и цитопротективно дејство.
-

1.9.2. Матичне (стем) ћелије

Матичне ћелије су недиференциране ћелије које имају способност да се диференцирају након митозе у било које специјализоване ћелије. Матичне ћелије се могу класификовати у две велике групе на основу њиховог извора: ембрионалне и одрасле матичне ћелије.

У протеклој деценији, матичне ћелије представљају водећи извор неуропротективних фактора у процесу регенерације нерава, претежно на експерименталном нивоу.

Након трансплантације матичних ћелија у оштећено подручје, само мали део њих може да се диференцира у неуронске ћелије *in vivo*, а за решавање овог проблема коришћена су хемијска једињења или фактори раста који могу да индукују неуронску диференцијацију. До сада су се показале као неуропротективне матичне ћелије коштане сржи, ћелије зубне пулпе, олфакторне ћелије и ћелије добијене из масног ткива (51,52).

1.9.3. Биоматеријали

Биолошки полимери имају високу биокompatibilност и биоразградивост и као такви неопходни су за физиолошко везивање и промоцију раста аксона. Биоматеријали су неопходни за стабилност трансплантираних матичних ћелија и фактора раста условљавајући њихово постепено ослобађање у околно ткиво. Постоји велики број биолошких материјала, али у неурорегенерацији су најзаступљеније наведене групе:

- природни биоматеријали - колаген и желатин;
- вештачки синтетички материјали - PGA;
- биоразградиви материјали новог типа.

Колаген

Употреба биолошких материјала нашла је своју примену у инжењерингу нервног ткива, а самим тим и у репарацији периферних нерава у облику биоразградивих нервних цеви. Индикувани су када је потребно премостити дефекте веће од 7 mm и у ту сврху се најчешће користе природни биоматеријали на бази пречишћеног колагена типа 1 (53).

Желатин

Желатин је денатурисани колаген, биоразградиви полимер, настао цепањем природне троструке спиралне структуре колагена у једноланчане молекуле. Желатин је мање имуноген у поређењу са својим претходником и има способност одржавања информативних сигнала као што је секвенца *Arg–Gli–Asp (RGD)*, промовишући ћелијску адхезију, диференцијацију, миграцију и пролиферацију. Како имплантиране матичне ћелије утичу на своју околину кроз лучење различитих фактора, судбину ћелија такође одређује исто микроокружење. Дакле, ако ћелије нису заштићене, њихови ефекти су или потиснути или ћелије умиру пре него што се индукује било која од њихових функција.

Да би се спречило тренутно одбацивање трансплантираних ћелија од стране домаћина, важно је убризгати их у хидрогел желатинску смешу, која омогућава њихову стабилност и сукцесивно ослобађање у околно ткиво (54).

Полигликолна киселина - PGA

PGA је синтетички биоматеријал који има добру биокомпатибилност, биоразградивост и није токсичан за организам. Високи трошкови производње ограничавају употребу вештачких полимера у експерименталним студијама (55).

Кситозан

Кситозан је биоразградиви материјал новог типа који се користи као вештачки нервни трансплантат. Кситозан има заштитну и водећу улогу у раној фази неурорегенерације, обезбеђује стабилно локализовано микроокружење, биокомпатибилан је има хидрофилну активност, имуноген је и спречава стварање ожиљака и фиброзе, постепено се апсорбује и разлаже у касној фази регенерације (56).

1.9.4. Фибрински лепак - FG

FG у хирургији се користи за заустављање микроциркулаторног крварења и крварења на местима која се не могу збринути хируршким шавом (али се не може користити као замена за хируршки шав). Поред адхезивног и хемостатског ефекта, FG има и ефекат заптивања. У области хирургије периферних нерава, употреба фибриног лепка као алтернативе конвенционалној микрохируршкој неурорафији последње две деценије постаје предмет интензивног испитивања доминантно на експерименталним животињским моделима. Предности фибриног лепка за реконструкцију нерва укључују техничку једноставност употребе, мање манипулације ткивом и краће време операције (57).

Комбиновање фибринског лепка са једним или два позициона шава омогућава прецизно поравнавање нервних влакана и чини се да обезбеђује довољну снагу да спречи дехисценцију. Први пут фибрински лепак је употребљен у реконструкцији периферних нерва на експерименталним животињама 1940. године од стране *Young* и *Madawar*, да би 1944. године *Cronkite* и *Tidric* патентирали препарат знатно веће чврстине, а самим тим и веће адхезивне моћи код слободних кожных трансплантата комбинујући фибриноген са тромбином, што претставља претечу данашњег фибринског лепка.

Комерцијални FG у Европи се употребљава од 1972. године а у САД од 1989. године (57).

У последње две деценије забележен је велики број студија које се баве улогом фибринског лепка у процесу регенерације фацијалног нерва на експерименталном нивоу.

FG се може користити самостално или у комбинацији са факторима раста. Доказано је да нема утицаја на процес регенерације нерава (58).

1.10. ПРОГНОЗА ОПОРАВКА ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Прогноза за пацијенте са трауматском парализом лица у потпуности зависи од тежине повреде и ефикасности њеног лечења. Пацијенти са лакшим до умереним повредама, односно пацијенти чија је парализа или непотпуна или одложена имају добре шансе за брз опоравак (*House-Brackmann* stepen I-II) (25).

Код пацијената код којих је дошло до трансекције стабла фацијалног нерва, а притом нису били подвргнути хируршком лечењу вероватно је да ће парализа фацијалног нерва (*House-Brackmann* stepen IV) дуготрајно перзистира. Када се трансекција догоди у дисталној грани фацијалног нерва, а не на нивоу главног стабла прогноза је боља јер је функционални дефицит мање значајан, као и потенцијал за развој синкинезија.

Без обзира да ли је потребно оперативно лечење или не и пацијенти и лекари морају бити стрпљиви јер је опоравак од повреде нерва спор, а због брзине поновног раста аксона од приближно 1 mm дневно, резултати регенерације се могу очекивати у периоду од 6. до 12. месеци (25).

1.11. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТИЊСКИ МОДЕЛ – КУНИЋ

Упркос напретку микрохируршке технологије и бољем разумевању регенерације нерава, постизање задовољавајућих резултата након повреде фацијалног нерва остаје тежак клинички проблем. Међу постојећим студијама регенерације периферних нерва, релативно мали број се фокусирао на фацијални нерв.

Након Другог светског рата Нирнбершким кодексом (1947) је одређено да истраживања на људима морају бити заснована на резултатима експерименталних студија на животињама. Коначан постулат експерименталних студија прихваћен је Хелсиншком декларацијом 1975. године (59).

Водећи се законским одредбама, испитивање хируршке реконструкције након трансекције фацијалног нерва, углавном је и даље на нивоу експерименталних студија.

Иако су пацови, мишеви и заморци нашироко коришћени као експериментални модели за студије спроведене на фацијалним нервима, предност се даје зечевима због лакше клиничке процене и веома високе морфолошке сличности мимичне мускулатуре са људима. Изразит развој мастикаторне мускулатуре чини га идеалним моделом за симулацију парализе фацијалног нерва (60).

Најчешћи експериментални модел је новозеландски бели зец (*Oryzomys cuniculus*).

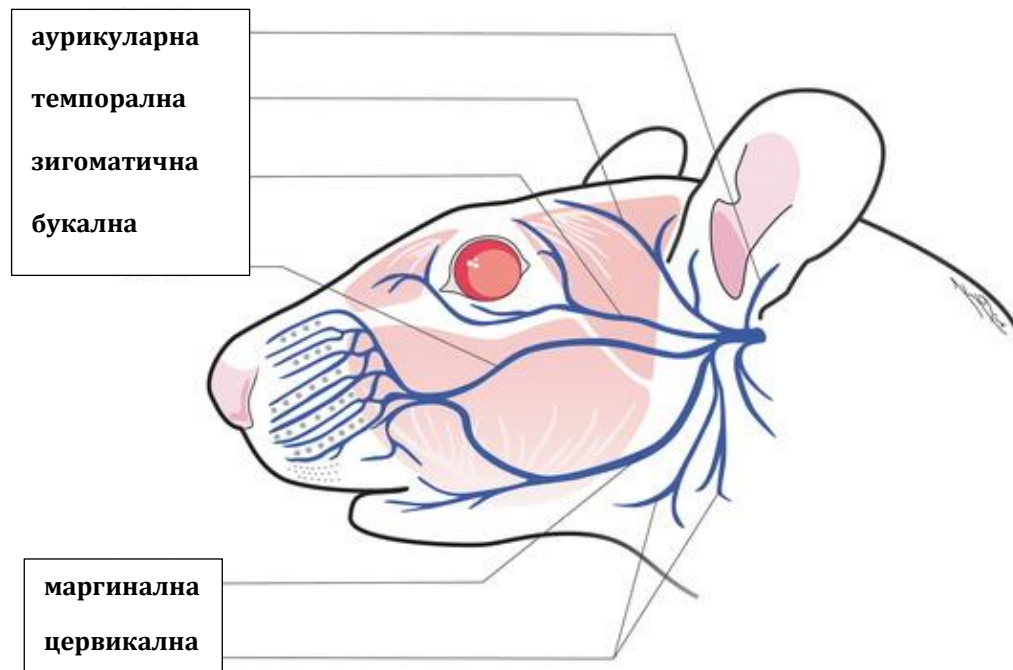
Фацијални нерв кунића је моторни нерв лица, који се назива и *интермедиофацијалис* када му се придруже сензорна, сензибилна и парасимпатичка влакна која чине *n. intermedius*. Моторна влакна потичу од неурона моторног фацијалног једра у тегментуму понса (*nc. motorius facialis*), а секреторна влакна парасимпатикуса у саставу *n. intermedius* су аксони неурона парасимпатичког једра у ретикуларној формацији понса (*nc. parasympathicus n. facialis*) (61).

Фацијални нерв излази из продужене мождине као формиран *n. intermediofacialis*, бочно од трапезоидног тела одмах поред *ponsa*. Протеже се бочно од VIII кранијалног нерва, са којим улази у *porus acusticus internus*. На крају *meatus acusticus externus* ова два нерва се раздвајају и *n. intermediofacialis* улази у *canalis facialis* петрозног дела темпоралне кости да би између вестибулима и пужа, према дорзалном зиду шупљине средњег ува, изашао на површину главе кроз *foramen stilomastoideum* (61).

Након изласка, нерв се протеже вентрално, рострално и бочно прекривен паротидном пљувачном жлездом и дели се на две завршне моторне букалне гране *rami buccolabiales* и *ramus marginalis mandibulae* од којих се издвајају осам завршних грана од чега шест инервишу мишиће лица. Завршне гране фацијалног нерва зеца су *r. auriculopalpebralis*, *r. auricularis interni*, *r. auricularis posterior*, *ramus colli*, *r. digastrici*, *r. parotidei*, *r. marginalis mandibulae* и *r. buccalis* (61) (Слика 1.8).

За разлику од анатомије људског фацијалног нерва, завршне аурикуларне гране фацијалног нерва зеца инервишу уво, а приликом симулације парализе фацијалног нерва праћењем покрета ува може да се утврди степен оштећења и опоравка нерва. Ова информација је важна при визуализацији кретања ува, као једне од метода током процене времена потрбног за регенерацију нерва. Даљи анатомски прегледи показали су комуникантне гране између тригеминалног и фацијалног нерва, као и између букалне гране фацијалиса и инфраорбиталног нерва (62).

Макроскопска анатомска запажања указују да је анатомски аспект зечјег фацијалног нерва близак људском фацијалном нерву, са малим одступањима у броју грана и групи мишића које инервишу што указује на то да је зечји модел најидеалнији за експерименталне хируршке захвате на фацијалном нерву (63).



Слика 1.8. Завршне гране фацијалног нерва кунића

Због свега наведеног, за ово истраживање одабран је експериментални модел кунића. Како се истраживање заснивало превасходно на утицају аутологне плазме богате тромбоцитима (концентрат аутологних крвних плочица), важно је било утврдити и крвну слику експерименталних животиња, кунића, као и битне биохемијске параметре који је одређују (64) (Табела 1.5).

Табела 1.5 Биохемијски параметри крви кунића

еритроцити	4-7 x10 ⁶ /μL
леукоцити	5-12 x 10 ³ /μL
тромбоцити	250-600 x 10³/μL
хемоглобин	10,0-15,5 g/dl
хематокрит	36-48%
билирубин	4,3-12,6 mmol/l
АСТ	10-98 IU/l
АЛТ	25-65 IU/l
глукоза	18 mmol/l

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗА ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви

Циљеви овог истраживања су:

1. Испитати функцију мимичних мишића лица код експерименталних животиња применом електромионеурографије обострано (експериментална и контролна страна) непосредно пре секције фацијалног нерва, као и шест и осам недеља након реконструкције фацијалног нерва само за експерименталну страну на основу наведених параметара :

-
- ✚ Латентни период регистрованих одговора (обе стране)
 - ✚ Брзина нервне проводљивости (моторна влакна) фацијалног нерва (обе стране)
 - ✚ Амплитуда мишићног акционог потенцијала (обе стране)
-

2. Патохистолошком анализом сегмента сецираног стабла нерва дужине 5mm из предела реконструкције неком од наведених метода експерименталне (леве) стране и дела нерва са контролне (десне) стране утврдити :

-
- ✚ Број новостворених аксона на месту секције нерва,
 - ✚ Степен заступљености везивног ткива
 - ✚ Неоваскуларизацију у близини новостворених аксона,
 - ✚ Број Шванових ћелија у пределу где је дошло до регенерације нерва.
-

3. Утврдити корелацију између новостворених аксона и Шванових ћелија.
4. Упоредити однос између брзине нервне проводљивости и броја новостворених аксона.
5. Методом субјективне визуализације поређењем покрета ушке експарименталне и контролне стране једном недељно на основу претходно осмишљене скале од 0 до 4, утврдити временски опоравак фацијалног нерва у периоду од шест и осам недеља.
6. Анализом електромионеурографских и патохистолошких резултата утврдити оптимални временски опсег потребан за регенерацију нерва.

2.2. Хипотеза

Примењени фактори раста који се ослобађају дегранулацијом α гранула тромбоцита из аутологне плазме обogaћене тромбоцитима на месту повређеног фацијалног нерва у комбинацији са неуросутомом знатно би скратили време регенерације фацијалног нерва и довели до бржег опоравка мимичне мускулатуре лица, након нанете повреде нерва.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Етичко одобрење

Сви експерименти спроведени на животињама су одобрени од стране Етичке комисије за заштиту добробити експерименталних животиња Медицинског факултета у Београду бр. 5603/2 у складу са етичким принципима према члану закона 33. и 34. Закона о добробити животиња (бр 41/09), Правилника о спровођењу огледа на животињама и држању експерименталних животиња (Сл. Гласник РС бр 39/10) и члана 15. , Правилника за рад са експерименталним животињама Медицинског факултета у Београду.

3.2. Лабораторијске животиње

Истраживање је урађено на чинчила кунићима (*Oryctolagus cuniculus*) (Слика 2.1). Коришћено је 48. чинчила кунића, тежине од 2.500 до 3.000 грама, мушког пола, старости између 3. и 4. месеца, груписаних у 4. групе. Кунићи су узгајани у Одељењу за експерименталну хирургију и узгој лабораторијских животиња, Центра војне службе Управе за војно здравство Министарства одбране.

Током читавог експерименталног периода животиње су чуване у стандардним условима у просторијама са константном температуром околине од 22 ± 1 °C, 10% до 55% влажности ваздуха и природним циклусом дан/ноћ. Кунићи су били смештени у одвојеним кавезима, храну и воду су добијали *ad libitum*.

За почетак експеримента сматра се повреда фацијалног нерва индукована секцијом пре бифуркације стабла на завршне гране у пределу паротидне ложе.

Експеримент је спроведен у три фазе, у периоду од шест и осам недеља.



2.1 Чинчила кунић (*Oryctolagus cuniculus*)

3.3. Експериментални дизајн и формирање група

Од укупно 48. експерименталних животиња оформљено је четири групе од којих је свака имала по две подгрупе.

Подела на подгрупе је извршена на основу временског опсега посматрања дефинисаног за процену нервне регенерације.

Животиње које су сврстане у погруппу „А“ (n=24) су жртвоване после шесте недеље експеримента, а животиње из подгрупе „Б“ (n=24) након осам недеља.

На основу материјала који су се користили у реконструкцији сецираног фацијалног нерва животиње су биле подељене у четири групе :

ГРУПЕ	МАТЕРИЈАЛ
Прва (I) група (n= 12)	примењена је сутура (S);
Друга (II) група (n= 12)	примењена је сутура и фибрински лепак (S, FG);
Трећа (III) група (n=12)	примењена је сутура и плазма обogaћена тромбоцитима (S, PRP);
Четврта (IV) група (n= 12)	примењена је комбинација : сутура, фибрински лепак и плазма обogaћена тромбоцитима (S, FG, PRP).

Експеримент је спроведен на левом фацијалном нерву код свих група док је десни коришћен као контрола за сваку јединку понаособ.

Експерименталним животињама је индукована повреда левог фацијалног нерва секцијом у пределу тункуса, непосредно пре рачвања на завршне гране.

Испитиваним групама нанета повреда фацијалног нерва је третирана применом различитих материјала (сутура, фибрински лепак, плазма обogaћена тромбоцитима), чији ефекат у смислу временског интервала опоравка нерва је приказан кроз резултате електромионеурографије, патохистолошких анализа и методом субјективне визуализације покрета ушке.

Електромионеурографија је спроведена у два акта, пре наношења повреде и непосредно пре жртвовања животиња у задатом временском опсегу по подгрупама, чиме је утврђена функција фацијалног нерва и опоравак испитиваних мимичних мишића лица одређивањем латентног периода регистрованих одговора, брзином нервне проводљивости (моторна влакна) фацијалног нерва и амплитудом мишићног акционог потенцијала.

Степен опоравка нерва је одређен на крају експеримента на основу патохистолошких анализа чиме је утврђен број новостворених аксона, степен неоваскуларизације, заступљеност везивног ткива и број Шванових ћелија.

Метода субјективне визуализације покрета ушке мерена је на сваких седам дана од почетка експеримента и приказује временски интервал опоравка повређеног нерва на основу поређења покретљивости ушке, експерименталне-леве са контролном-десном страном.

3.4. ФАЗЕ СТУДИЈСКОГ ПРОТОКОЛА

3.4.1. ПРВА ФАЗА

У првој фази експеримента након анестезирања животиња спроведено је електрофизиолошко испитивање функције фацијалног нерва кунића обострано, (леви-експериментални; десни-контролни) код свих група обе подгрупе (n=48).

3.4.1.1. Анестезирање животиња

За све интвенције које су спроведене у току експеримента употребљени су дисоцијативни анестетици. Одлика ових анестетика је изазивање стања анестезије при којој је животиња привидно одвојена од своје средине (дисоцијативна раздвајања) и својом активношћу у различитим деловима мозга доводе до имобилизације, аналгезије и депресије ЦНС-а. Дисоцијативни анестетици се карактеришу кеталептоидним стањем у коме су очи животиње отворене уз назначен нистагмус.

Најчешћи анестетик са овим дејством је кетамин хлорид чији недостатак је обилна саливација и слаба релаксација мишића. У циљу превазилажења наведених нуспојава кетамин хлорид је употребљен у комбинацији са ацепромазином и атропином.

Кунићи су анестезирани комбинацијом кетамина (35mg/kg телесне масе i.m.), ацепромазина (0,1mg/kg телесне масе i.m) и атропина (0,04mg/kg телесне масе i.m.). Ацепромазин у комбинацији са кетамином даје стабилну општу анестезију са добром висцералном аналгезијом и миорелаксацијом уз добар опоравак.

Пре увођења у анестезију експерименталним животињама је субкутано апликован атропине због његовог спазмодичног и антихолинергичког дејства. У свим фазама експеримента животиње су анестезиране по наведеном протоколу.

3.4.1.2. Електромионеурографија

Електромионеурографија (EMNG) је електрофизиолошка метода регистрованих акционих потенцијала моторних јединица мишића и испитивања проводљивости периферних нерава, у циљу утврђивања обима и тежине оштећења нерва са праћењем функционалног опоравка мишића. Састоји се од детекционе-електромиографије (EMG), која региструје акционе потенцијале у мишићу који се дефинишу кроз летенцу и амплитуду и на тај начин пружа информације о аксонској лезији и стимулационе-електронеурографије (ENG), код које се региструју евоцирани потенцијали настали електричном стимулацијом нервног стабла, прати се кроз параметре брзине нервне проводљивости.

Реч је о комплементарним методама које се увек изводе заједно у оквиру EMNG.

EMNG-ом забележени су сложени мишићни акциони потенцијали мимичне мускулатуре лица након транскутане стимулације стабла фацијалног нерва електричним путем. EMNG је у првој фази експеримента спроведена за оба фацијална нерва (леви-експериментални; десни-контролни), код свих група (I, II, III, IV), обе подгрупе (“А” ; “Б”).

EMNG-ом је одређен:

-
- ✚ Латентни период регистрованих одговора (обе стране)
 - ✚ Брзина нервне проводљивости (моторна влакна) фацијалног нерва (обе стране)
 - ✚ Амплитуда мишићног акционог потенцијала (обе стране)
-

Проводљивост моторних влакана у саставу периферног сегмента фацијалног нерва испитивана је применом површинске стимулационе електроде, две монополарне иглене електроде пласиране су субкутано у симетричним тачкама инервационог поља фацијалног нерва (*m.orbicularis oris* и *m.orbicularis oculi*) док је изнад стиломастоидног отвора пласирана биполарна електрода која је изложена стимулацији и повезана са електромиографом, који бележи електричну активност између електрода. Апарат је подешен за оптималну дијагностику следећим перформансама : осетљивост је подешена на вредност 10.000 Mv, филтрирање појачала од 1-10 kXz, временски оквир подешен на 10 ms, трајање стимулуса максимално 200µs, максимални стимулус је ограничен на 20 mA са брзином стимулације 1,9s. Стимулација фацијалног нерва је започета са 0,1 mA са повећавањем до тренутка добијања максималног мишићног акционог потенцијала. Максимални одговор (сложени моторни акциони потенцијал) је секвенцијално забележен супрамаксималним стимулусом када долази до надражаја свих аксона који инервишу одговарајући мишић, а регистрациона електрода бележи одговор у мишићу који карактерише бифазни облик са негативном дефлексијом.

Анализом изазваног потенцијала одређена је превасходно латенца која представља време протекло од тренутка стимулације нерва до појаве отклона изоелектричне линије-одговора, при регистравању у циљном мишићу (вредност се изражава у милисекундама - ms).

Латенца представља време потребно да акциони потенцијал у најбрже проводљивим нервним влакнима стигне до нервних завршетака и активира мишићна влакна, зависи од растојања између стимулационе електроде и мишића.

Други параметар испитивања мишићне активности амплитуда одређена је као однос амплитуде (растојање између позитивних и негативних таласа односно висина таласа на изоелектричној линији, изражава се у микроволтима - μV) једне стране (повређене) у односу на другу (здраву) страну прихватљиве формуле, а добијена вредност је приказана у процентима.

$$A = \text{амплитуда повређене стране} / \text{амплитуда здраве стране} \times 100 = \text{-----}\%$$

Амплитуда као показатељ јачине мишићне активности одражава број сачуваних мотонеурона на повређеној страни. Успешан опоравак функције мишића се сматра уколико је проценат вредности амплитуде повређене стране између 70% и 95% амплитуде здраве стране (65).

Брзина нервне проводљивости (брзина проласка електричног импулса дуж нерва) одређена је као количник разлике пута (S), који акциони потенцијал пређе између два мерна места и разлике латенци (L) за та два мерна места, добијене вредности су приказане као метар у секунди (m/sec).

$$\text{Брзина нервне проводљивости (BNP)} = S/L \text{ (} m/sec \text{)}$$

Продужено време латенце и снижена амплитуда мишићног акционог потенцијала су карактеристични за оштећење неуромишићне функције након повреде .

Када је примарно реч о демијелинизацији брзина нервне проводљивости је спорија од 75% од доње границе нормалних вредности са значајним продужењем латенце преко 130% од горње границе нормалних вредности. У случају аксонске лезије амплитуда значајно опада, брзина проводљивости се смањује али не мање од 75% од доње границе нормалних вредности док је латенца продужена али не преко 130% од горње границе нормалних вредности.

У фази опоравка нерва долази до смањења времена латенце и повећања амплитуде, које прати већа брзина нервне проводљивости.

3.4.2. ДРУГА ФАЗА

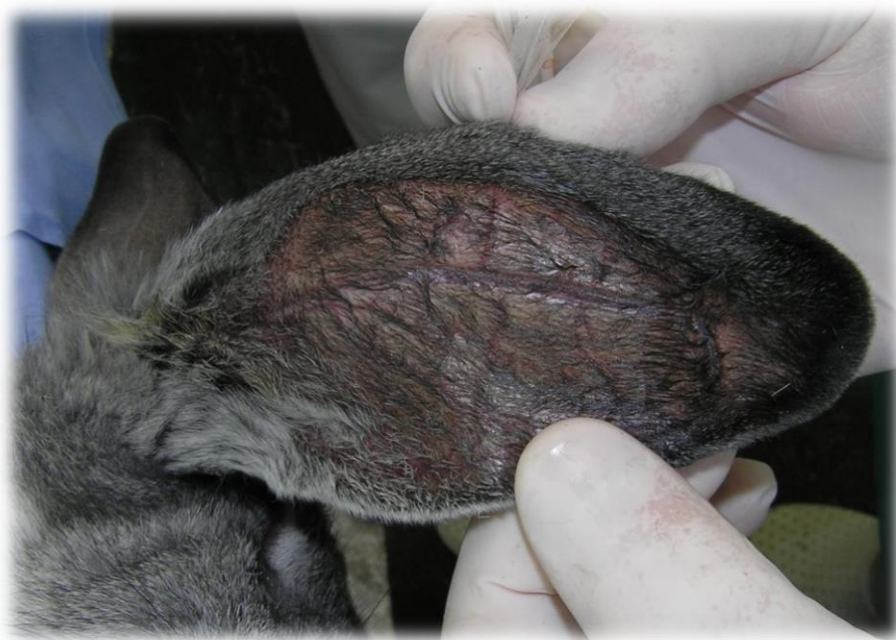
У оквиру друге фазе животиње су анестезиране по претходно утврђеном протоколу описаном у првој фази.

Спроведене су три процедуре:

-
1. припрема плазме обogaћене тромбоцитима,
-
2. хируршка процедура идентификације и секције фацијалног нерва
-
3. реконструкција сецираног нерва по групама студијског протоколае
-

3.4.2.1. Припрема аутологне плазме обogaћене тромбоцитима

Код свих кунића по групама припремљено је место за узимање узорка крви венепункцијом из ушне вене у стерилним условима (дезинфекција Коданом) (Слика 2.2, 2.3).



Слика 2.2 Идентификована ушна вена



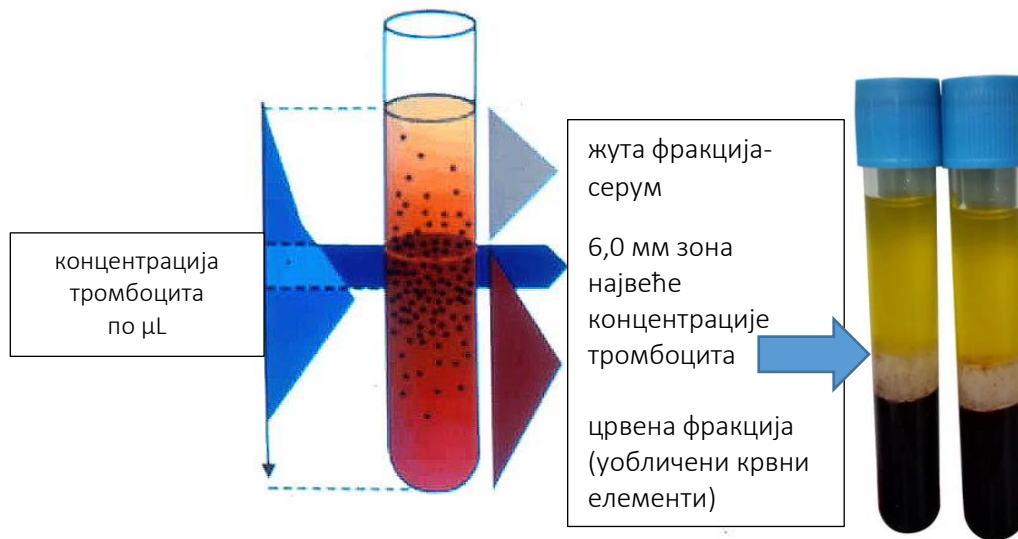
Слика 2.3 Венепункција

Плазма обогаћена тромбоцитима је припремљена од 5 ml крви узете из ушне вене од сваког кунића у епрувете са 0,5ml натријум цитрата, методом двоструког центрифуговања у лабораторијским условима, посебним технолошким поступком у Институту за медицинска истраживања ВМА. Поступак је спроводен у асептичним условима, центрифуговање је обављено у апарату ALC PK 110. Око 1 ml пуне крви је одвојено за почетну анализу параметара броја тромбоцита у пуној крви.

Епрувете са цитратом (0,5ml) и узетом крви су постављене у апарат за центрифуговање 1200 *obrt/min* (160G) и центрифуговане су 20 минута.

Након првог центрифуговања добијене су две фракције у епрувети, доња црвена (еритроцити, тромбоцити, леукоцити) и друга горња жута фракција (плазма и тромбоцити). Унутар зоне доње фракције разликују се два нивоа: горњи са највећом концентрацијом тромбоцита (првих 6 mm) и доњи ниво са преосталим ћелијским елементима.

Одређена је демаркациона граница између црвене (еритроцити) и жуте фракције (плазма). Шест милиметара од демаркационе линије је означена граница. Садржај изнад означене границе је аспириран и други пут центрифугован 2000 *obrt/min* (400 G) у трајању од 15 минута након чега су добијена два слоја, горње две трећине (жута фракција) коју чини плазма сиромашна тромбоцитима (PPP) и доњу трећину (црвена фракција) коју сачињава плазма богата тромбоцитима (PRP). Пипетирањем је уклоњена жута фракција, а остатак је ушао у припрему за употребу (Шема 2.1).



Шема 2.1 Шематски приказ припреме PRP

Овај тромбоцитни концентрат прелази у гел стање за 15 до 20 минута и у начелу може се користити у наредних 60 минута у том гел стању. Познато је да активацију тромбоцитног гела поспешује калцијум хлорид (омогућава коагулацију плазме), како би се убрзала активација PRP гела неопходно је калцијум хлорид ставити у водено купатило на 37°C у трајању од 10 минута. Из сваког припремљеног концентрата тромбоцита одвојено је 200µL узорка за израчунавање броја тромбоцита.

Од узетих 5ml крви кунића добијено је по 0,3 ml концентрата тромбоцита који је уз додатак антифибринолитика (транексамична киселина 1-5mg на 0,5ml криопреципитата) и калцијум хлорида (0,05ml 10% CaCl на 1ml PRP), као активатора апликован на месту где је урађена секција нерва.

3.4.2.2. Хируршки индукована секције нерва

Преоперативно је примењена иста доза анестетика као у првој фази, с тим да је општа анестезија допуњена локалном применом-инфилтрацијом 3% мепивакаина са епинефрином у дози 1:100000 на месту хируршког реза.

Код свих кунића избријана је лева половина лица и дезинфикована Коданом (Слика 2.4).

Преаурикуларном резом оштром препарацијом коже и поткожног ткива одигне се кожни режањ. Након фиксирања кожног режња тупом препарацијом приступи се ткиву паротидне пљувачне жлезда у циљу идентификације места излазишта фацијалног нерва из стилوماстoidalног отвора. Приликом препарације придржавали смо се основних правила на основу познатих оријентира идентификације места где фацијални нерв излази из стилوماстoidalног отвора, односно где почиње његов екстракранијални део пута.

У ткиву паротидне пљувачне жлезде идентификован је трункус фацијалног нерва, а затим испрепарисане завршне гране паротидног плексуса. Означен је део трункуса где ће се спровести секција нерва.



Слика 2.4. Припремљено оперативно поље

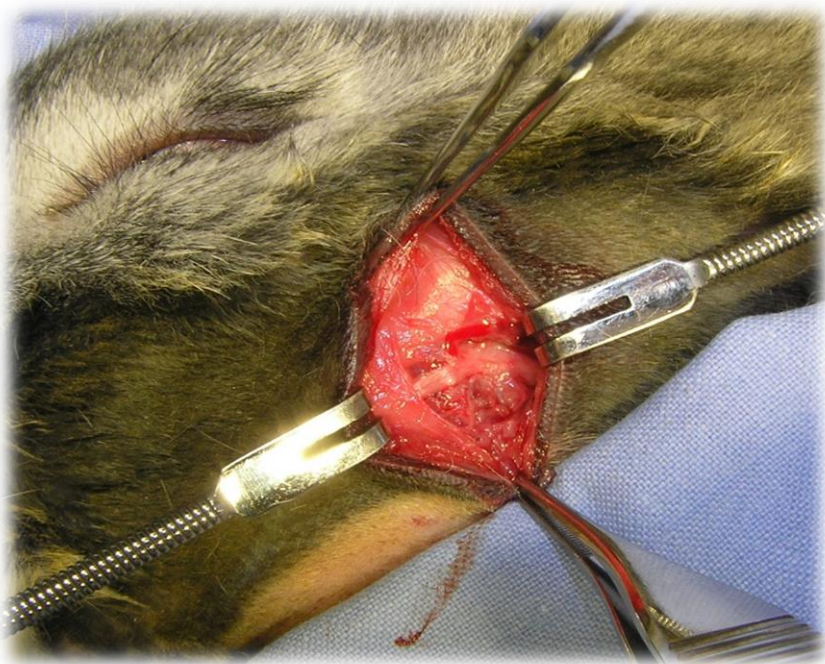
Етапе у оквиру друге фазе експеримента приказане су на сликама (Слике 2.5; 2.6; 2.7; 2.8).



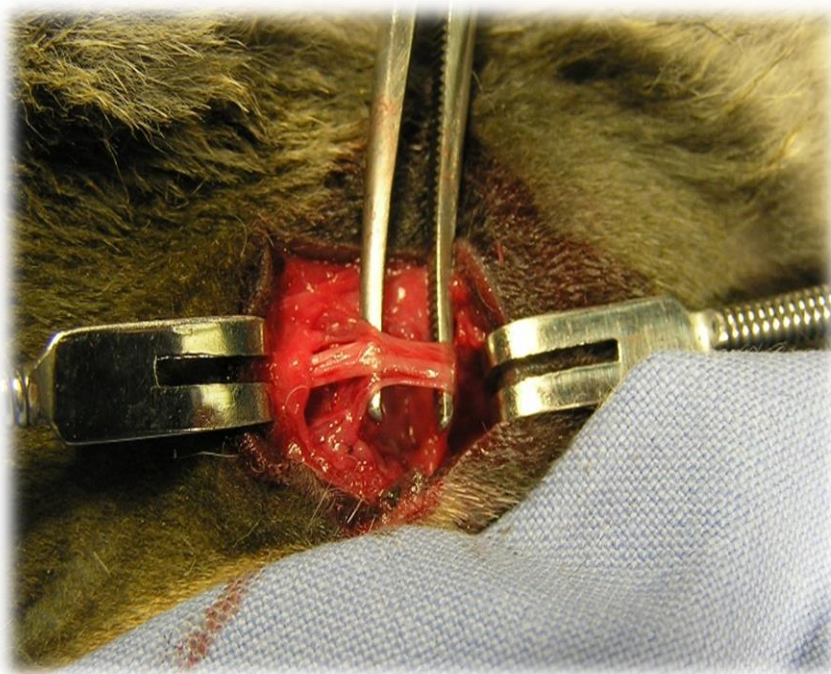
Слика 2.5. Инцизија коже и поткожног ткива



Слика 2.6. Тупа препарација ткива паротидне пљувачне жлезде



Слика 2.7. Идентификација трункуса фацијалног нерва



Слика 2.8. Део нерва припремљен за секцију

3.4.2.3. Реконструкција сецираног нерва

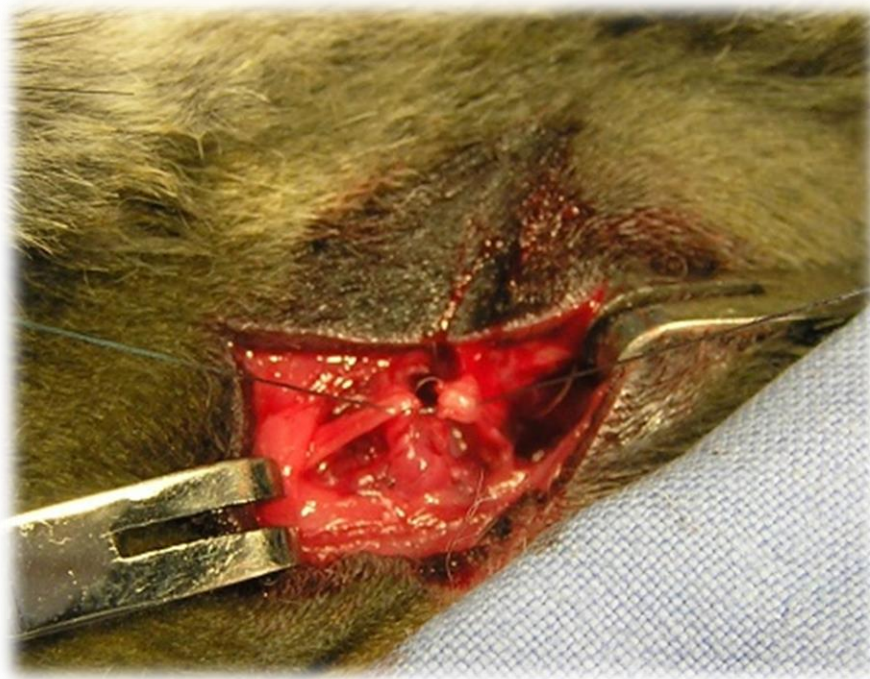
Пар милиметара пре бифуркације стабла нерва урађена је секција трункуса скалпелом сечива број 11 у једном потезу. Добијени дистални и проксимални сегменти нерва припремљени су за даљу процедуру метода реконструкције по наведеним групама .

Нервни крајци су пажљиво атрауматски приближени анатомском пинцетом у циљу мање трауматизације ткива и реконструисани појединачним епинеуралним сатурама по два шавца на сваком сегменту нерва најлоном 9-0 (Слика 2.9).

Крај се секао на дужини од 1cm, да би у току следеће фазе експеримента био препознатљив и доступан за правилно узимање узорка за патохистолошку анализу са места где је урађена секција нерва (Слика 2.10).

Реконструкција нерва се спроводила по групама наведеним методама:

-
- ✚ I група - сатура
 - ✚ II група - сатура и фибрински лепак
 - ✚ III група - сатура и плазма обогаћена тромбоцитима
 - ✚ IV група - сатура, фибрински лепак и плазма обогаћена тромбоцитима
-



Слика 2.9 Ушивени сецирани сегменти нерва (епинеурални шав)



Слика 2.10. Приказан конач као водич за место узимања узорка нерва

Код I групе као метода реконструкције употребљен је конач-најлон дебљине 9-0, спроведена је епинеурална сатура са по два шави на оба сегмента нерва, укупно 12 кунића – по шест у обе подгрупе.

Код II групе комбинована је сатура (најлон 9-0) са фибринским лепком у облику готовог препарата (*Beriplast P Combi-set*), укупно 12 кунића – по шест у обе подгрупе.

FG је апликован директно комбиновањем обе компоненте у већ припремљеном облику преко сатуре у танком слоју. Састав комерцијалног препарата FG приказан је у Табели 2.1.

Табела 2.1. Састав FG-Beriplast

Combi Set I - прва компонента		u 3 ml
Бочица 1: концентрат фибриногена: (прашак)		
укупна сува супстанца		522 mg фибриноген
(протеинска фракција хумане плазме)		270 mg
хумани фактор коагулације XIII (протеинска фракција хумане плазме)		180i.j.
Бочица 2: раствор аprotина: (растварач)		
запремина		3,0 ml
аprotинин пореклом из говеђих плућа		3000 KIU*
што одговара		1,67 PEU**
Combi Set II - друга компонента		u 3 mL
Бочица 3: тромбин: (прашак)		
укупна сува супстанца		22,8 mg
са тромбинском активношћу фракције протеина хумане плазме		1500 i.j
Бочица 4: раствор калцијум-хлорида: (растварач)		
Запремина		3,0 ml
калцијум-хлорид, дихидрат		17,7 mg

*KIU = Kalikreinska Inaktivaciona Jedinica ** PEU = Ph.Eur. Jedinica (1 PEU $\triangleq$ 1800 KIU)

Код III експерименталне групе место реконструисаног нерва сугуром најлоном 9-0 се прекривало апликовањем претходно припремљеном плазмом богатом тромбоцитима волумена 0,3 ml уз додатак антифибринолитика (транексамична киселина 1-5 mg на 0,5 ml криопреципитата), наведеном методом путем стерилног једнокомпонентног шприца (укупно 12. кунића – по шест у обе подгрупе) (Слика 2.11).

Код IV групе на месту реконструкције након сатуре (најлон 9-0) нерва, пласирани су комбиновано FG и плазма богата тромбоцитима.

Прва компонента фибриноског лепка се путем стерилног шприца апликовала у епрувету где је припремљен концентрат тромбоцита волумена 0,3ml уз додатак антифибринолитика (транексамична киселина 1-5mg на 0,5ml криопреципитата). Овако припремљен тромбоцитни гел се пребацивао у други стерилни шприц.

Помешан тромбоцитни гел се сукцесивно са другом компонентом фибриноског лепка која се налази припремљена у другом шприцу апликовао на место реконструкције нерва (укупно 12. кунића – по шест у обе подгрупе) (Слика 2.12).



Слика 2.11 Пласиран припремљен препарат PRP



Слика 2.12 Сукцесивна примена FG и PRP

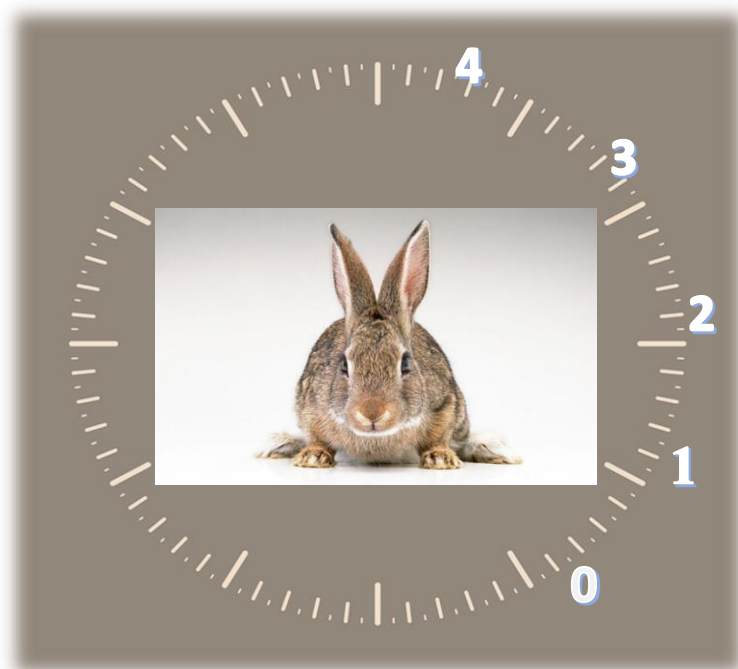
Након завршеног процеса реконструкције сецираног нерва успостављала се нормална хемотаза, репонирао кожни режањ и рана је ушивена појединачним шавовима најлоном 5-0. Ране су третиране по задатим хируршким постулатима. По истеку седам дана шавови су уклоњени, све ране су зарасле без знакова инфекције и дехисценције.

3.4.2.4 Визуализација покрета

Након завршене реконструкције нерва у току трајања експеримента једном недељно, компаративном методом је контролисана покретљивост ушке са леве, експерименталне (трансециране и репарисане) стране и потом упоређивана са покретљивошћу контролне (десне) ушке користећи скалу од 5. тачака, у распону од 0 до 4.

0 = нема покрета, 1 = слабо детектабилни покрети, 2 = мање значајни покрети,
3 = већи асиметрични покрети, 4 = симетрични покрети

Скалу субјективне визуализације покрета применио је *Farrag* (66) у свом експерименту на пацовима при чему је пратио покрете бркова. У овом истраживању употребљена је скала за праћење покрета ушке која у доступној литератури није нађена (Шема 2.2)



Шема 2.2 Скала за визуализацију покрета

3.4.3. ТРЕЋА ФАЗА

У трећој фази експеримента након анестезирања животиња по утврђеном протоколу спроведене су три процедуре, код обе подгрупе са временском дистанцом од две недеље. Код подгрупе „А“ животиње су жртвоване након спроведених процедура после 6. недеља док је код подгрупе „Б“ жртвовање спроведено након 8. недеља.

У оквиру треће фазе спроведене су наведене процедуре:

1. EMNG левог (експерименталног) фацијалног нерва.

2. Хируршка процедура узимања исечка нерва дужине 5mm са места реконструкције левог (експериментална страна) фацијалног нерва и део десног (контролна страна) фацијалног нерва на истом нивоу (пре бифуркације).

3. Хистолошка верификација ексцидираног сегмента нерва обе стране.

3.4.3.1. Електромионеурографија

Метода електромионеурографије је спроведена идентично као и у првој фази експеримента, само за леву (експерименталну страну) са одређивањем истих параметара.

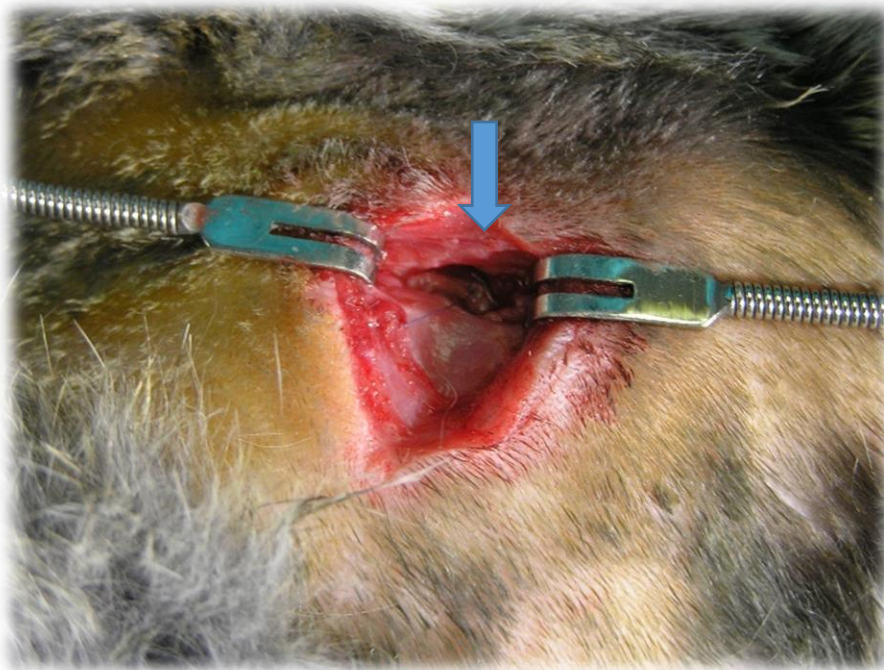
3.4.3.2. Хируршка процедура узимања узорка нерва

Хируршка процедура је спроведена у два акта.

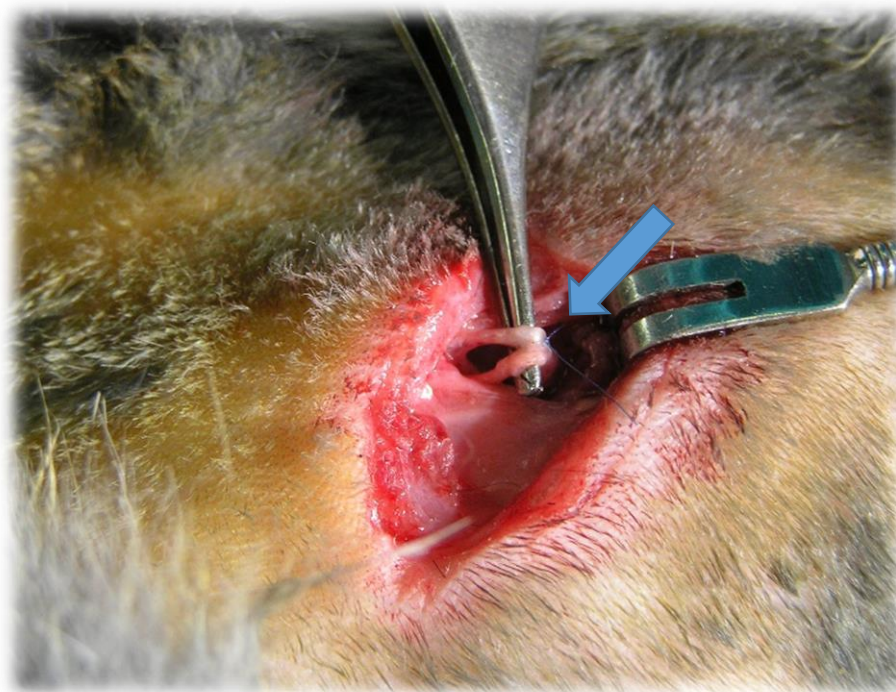
У првом акту лева страна лица је припремљена за хируршку интервенцију дезинфикована Коданом и избријана након чега је одигнут кожни режањ. Тупом препарацијом пажљиво се приступи ткиву паротидне пљувачне жлезде са минималном траумом ткива, идентификује стабло фацијалног нерва у предвиђеном анатомском подручју непосредно након изласка нерва из стиломастичног отвора.

Прикаже се део стабла фацијалног нерва који је у претходној фази експеримента реконструисан неком од наведених метода. Идентификовани део нерва се препарише од околног жлезданог ткива и ослободи са свих страна (Слика 2.13).

Како је у другој фази експеримента у процесу реконструкције сегмента нерва остављен крај дужине 1cm идентификација је олакшана, а самим тим и избегнута грешка приликом процеса узимања узорка за хистолошку анализу (Слика 2.14).



Слика 2.13 Приступ месту реконструкције нерва



Слика 2.14 Идентификован део реконструисаног нерва видљив конца на месту сутуре

Након идентификације места реконструкције нерва исти се атрауматски одвоји од околног ткива паротидне пљувачне жлезде. Узорак нерва дужине око 5mm, по 2,5 mm са сваке стране сuture се сецира скалпелом (број 11) у једном потезу и одложи у већ припремљене означене стерилне бочице.

Препарати су одложени и фиксирани у припремљеним и означеним бочицама са 4% пуферованог раствора формалина. Свака бочица је означена редним бројем кунића и страном са које је узорак узет. По прикупљању свих препарата у назначеним групама епрувете се транспортују у Институт за патологију Ветеринарског факултета у Београду.

У другом акту на исти начин се приступило фацијалном нерву са десне (контролне) стране. Након идентификације тункуса узиман је сегмент стабла нерва у дужини од 5mm пре рачвања на завршне гране. Транспортиван је на исти начин као и део са леве стране.

Поступак је идентично спроведен код свих животиња све четири групе у временском периоду 6. и 8. недеља након реконструкције фацијалног нерва.

3.4.3.3. Хистолошка анализа

Хируршки узорци нерва у дужини од 5mm, фиксирани су 24 сата у 4% пуферованом раствору формалина волумена 20 пута већем од волумена ткива у бочицама које су обележене редним бројем кунића и страном одакле је узет узорак ткива. Тако спремљени узорци су транспортовани у Институт за патологију Ветеринарског факултета у Београду. Након фиксирања и испирања водом даље су узорци припремани рутинском процедуром која обухвата дехидратацију, просветљавање, импрегнацију и калупљење у парафину. Сваки узорак нерва затим је дехидрирани у алкохолу растуће концентрације (70%-100%) и липофилизован у ксилолу.

Припремљени узорци су укалупљени у парафину и сечени попречно, серијски, на микротому, а редослед пресека пажљиво је обележен. Ткивни пресеци дебљине 3-5 μ m су монтирани на специјалне високоадхезивне стаклене плочице (Super Frost Plus, DAKO, Denmark), сушени 60 минута у термостату на 56°C, а потом бојени хематоксилин еозином и толудин-плавом бојом у више фаза према упутству произвођача.

Бојењем са хематоксилин еозином на посматраном препарату једра Шванових ћелија се приказују љубичасто, а цитоплазма и везивно ткиво розе бојом. Бојењем са толудин-плавим структуре нерва се приказују у разним нијансама од светло до тамно плаве боје.

Применили смо и посебне метода бојења мијелина по *Kluver-Barreri* методом бојења са *luxol fast blue (LFB)*. LFB је дериват тетрабензотеразо-порфирина, а порфирина имају селективни афинитет за мијелин, односно имају способност везивања за фосфолипидне структуре као што су лектини и сфингомијелини. Овом методом мијелин се боји тиркизноплаво, неурони и једра Шванових ћелија су обојени ружичасто до љубичасто.

Применили смо и хистохемиску методу бојења по *Massoni* са две варијанте трихромског бојења – са анилинским плавим и са *Goldnerovim* светлозеленим.

У овој методи бојења користи се раствор гвожђевитог хематоксилина по *Weigertu*, алкохолни раствор пикринске киселине, кисели раствор фосфолибдена и раствор анилинског плавог.

Резултат бојења су црно обојена једра ћелија, црвено су обојени цитоплазма, кератин, мишићна влакна, плаво се боје колагена влакна, а еритроцити су жуто обојени.

Код трихромног бојења по *Massonu* са *Goldnerovim* светло зеленим користе се исти раствори као код претходно описане варијате ове методе, само што се уместо анилинског плавог употребљава раствор светлосиног по *Goldneru*. Резултат бојења су зелено обојена колагена влакна.

Препарати су прегледани светлосним микроскопом при увећању 400Ks, након чега су фотографисани у форми дигиталних микрофотографија и анализирани софтверским (*Imagel*) програмом.

Одређен је :

✚ Број аксона израчунат је, као просечни број аксона два рандомизована поља сваког препарата при микроскопском увећању $\times 400$, величине поља $250 \times 250 \mu\text{m}$ и изражен је бројчано.

✚ Број Шванових ћелија, такође је одређен на идентичан начин на истом увећању и у истим пољима, а ове вредности су послужиле, да се добије просечан однос између броја аксона и Шванових ћелија

✚ Степен заступљености везивног ткива је одређен дескрипцијом хистолошких узорака као квалитативни однос површине коју заузима везивно ткиво на посматраном пресеку нерва и приказан оценама од 1- 4.
(1-у траговима заузима мање од 20% површине пресека нерва; 2-у групама заузима од 20-50 %; 3 - око појединачних аксона заузима од 50-80% ; 4-око већег броја аксона, заузима више од 80% површине пресека нерва).
У овом случају већи број одговара већем проценту заступљености везивног ткива, односно већи број указује на слабији процес неурорегенерације.

✚ Степен неоваскуларизације је такође одређен дескрипцијом хистолошких узорака површине који заузимају новоформиран крвни судови на посматраном пресеку нерва и приказан оценама од 1-3 (1-нема крвних судова; 2-појединачни крвни судови заузимају до 50 % површине пресека нерва; 3-мрежа крвних судова заузимају више од 50% површине пресека нерва).
Већи број је еквивалент већој процентуалној заступљености новоформиран крвних судова и указује на већу успешност неурорегенерације.

3.5. Жртвовање животиња

Све животиње су жртвоване убризгавањем леталне дозе пентобарбитала, 20 mg/kg i.v у ушну вену у временском периоду шест (подгрупа „А“) и осам недеља (подгрупа „Б“) након почетка експеримента по завршетку друге етапе треће фазе. Пет минута након убризгавања дошло је до депресије дисања код животиња.

Према литератури код већине анималних модела фацијалног нерва жртвовање се спроводи 6. недеља од индукције повреде (63,66,67,68). Из тих разлога, ми смо се одлучили да жртвовање буде 6. недеља након реконструкције нерва. У циљу даљег праћења процеса регенерације определили смо се и за 8. недеља, такође на основу случајева из литературе (24,65).

За време трајања експеримента поштована су сва начела добробити животиња.

3.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА

Све добијене вредности су презентоване као средња вредност $\pm$ стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности коришћен је Т тест за обележја са нормалном расподелом. Студентовим Т тестом упоређене су средње вредности.

Минимални ниво статистичке значајности установљен је на $p < 0.05$.

За непараметарска обележја коришћени су *Kruskal-Wallis* тест (за процену значајности групних разлика) и *Wilcoxon-Mann-Whitney* тест (за поређење парова узорака унутар група, како би се са сигурношћу утврдили који узорци, тј. примењене методе реконструкције нерва имају статистички значајну разлику у ефектима). Сви добијени резултати приказани су табеларно, графички или путем хистиограма. Статистичка обрада резултата урађена је у *GraphPad Prism 9.0.0* пакету, са значајношћу $p < 0.05$.

4 . РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Ово истраживање је урађено ради испитивања сврсисходности примене фактора раста добијених из аутологне плазме богате тромбоцитима у процесу регенерације фацијалног нерва, добијања прецизних података о времену потребном за комплетан опоравак нерва и потенцијалне клиничке примене чиме би се побољшала перспектива лечења у смислу реконструкције повређеног фацијалног нерва, а самим тим и убрзао функционални опоравак мимичних мишића лица инервисаних истим.

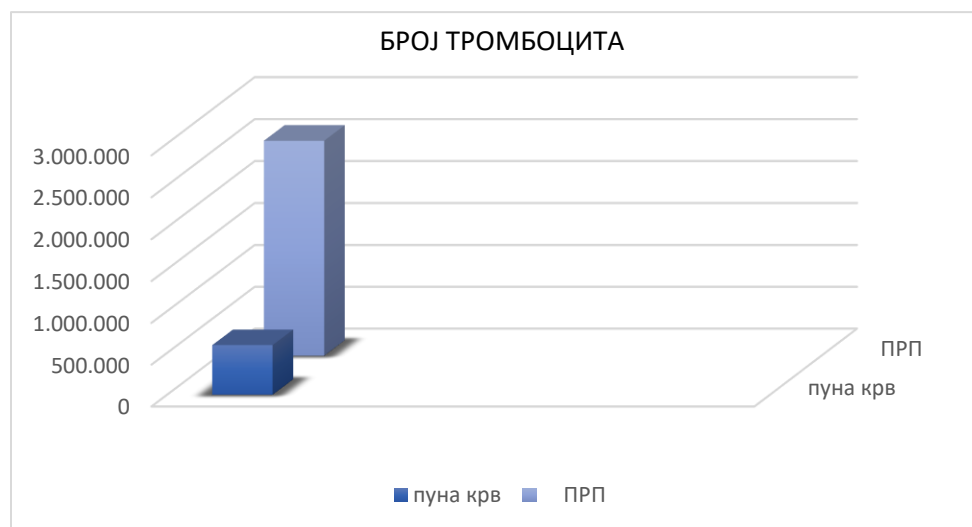
4.1. БРОЈ ТРОМБОЦИТА

Како је циљ ове студије доказивање успешности примене фактора раста добијених из аутологне плазме богате тромбоцитима у процесу регенерације повређеног фацијалног нерва, одређен је број тромбоцита из пуне крви сваког кунића обе подгрупе ($n = 48$) и израчуната је њихова средња вредност стандардним поступком мерења.

Овај податак је важан јер је у наставку истраживања један сегмент био усмерен на одређивање концентрације тромбоцита у PRP у односу на концентрацију истих у пуној крви са циљем одређивања оптималних доза концентрације тромбоцита, као извора фактора раста у процесу неурорегенерације.

Укупан број тромбоцита након сумирања средњих вредности обе подгрупе ($n = 48$) износио је $593.780 \pm 116.349 \times 10^3 / \mu L$.

У концентрату плазме богате тромбоцитима број тромбоцита износио је $2.567.523 \pm 1.126.519 \times 10^3 / \mu L$, што значи да је концентрација тромбоцита у PRP четири пута већа него у пуној крви (Графикон 4.1). Овај податак је битан у даљем упоређивању са подацима доступне литературе.



Графикон 4.1. Однос броја тромбоцита у пуној крви и PRP

4.2. ЕЛЕКТРОДИЈАГНОСТИЧКЕ МЕТОДЕ

Електродијагностичким анализама фацијалног нерва и мимичне мускулатуре лица одредили су се параметри на основу којих је процењена ефикасност метода примењених у репарацији хируршки индуковане повреде фацијалног нерва (Слика 4.1).

Методе које су се користиле приказале су функцију фацијалног нерва по групама :

- ✚ група I → сутура ,
- ✚ група II → сутура и FG,
- ✚ група III → сутура, FG и PRP,
- ✚ група IV → сутура и PRP.

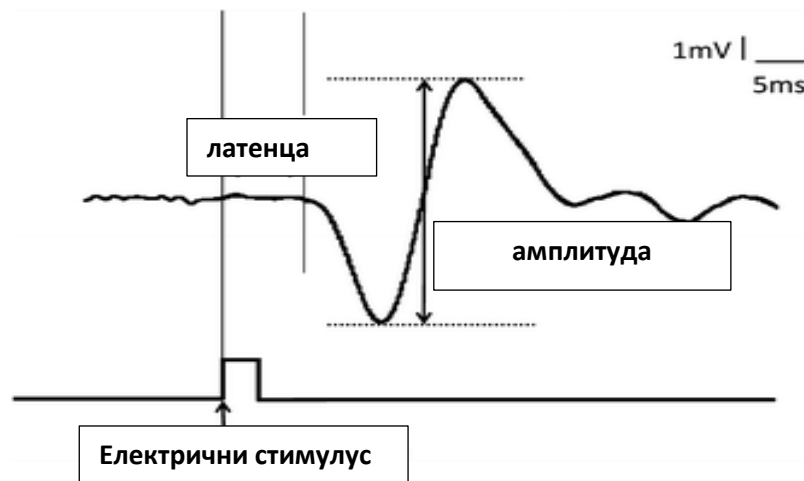
Све методе су спроведене у временски задатом опсегу посматрања, шест (подгрупа „А“) и осам недеља (подгрупа „Б“) од периода протеклог од хируршки индуковане секције и реконструкције нерва неком од наведених метода.

Одређена је латенца, брзина нервне проводљивости и амплитуда акционог потенцијала испитиваних мишића за све групе обе подгрупе на експерименталној (левој) и контролној (десној) страни. Резултати су приказани за сваку групу посебно пре индуковане повреде (секције) и након реконструкције нерва неком од наведених метода у временском опсегу посматрања. Добијени резултати су упоређени међу групама, као и између сваке групе појединачно пре секције и након реконструкције нерва. Средње вредности наведених параметара су графички приказане за обе подгрупе.

Основни параметри који су одређени у оквиру електрофизиолошких испитивања су :

- ✚ латенца регистрованих одговора (L)
- ✚ брзина нервне проводљивости (BNP)
- ✚ амплитуда мишићног одговора (A)

Слика 4.1. Параметри електрофизиолошког испитивања



4.2.1. ОДРЕЂИВАЊЕ ЛАТЕНЦЕ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Латенца регистрованих одговора представља време између првог стимулуса и првог таласа који се појави на изоелектричној линији (дефлексија мишићног потенцијала), израчунава се у милисекундама (ms).

Латенца је израчуната у оквиру прве (пре хируршки индуковане секције нерва) и треће (након реконструкције нерва) фазе експеримента, за све животиње у временски задатом интервалу од шест (подгрупа „А“), и осам недеља (подгрупа „Б“), након спроведене реконструкције нерва за леву (експериментална) и десну (контролна) страну.

У трећој фази експеримента упоређене су вредности латенце по групама само за експерименталну (леву) страну јер су резултати добијени у оквиру прве фазе указали на подударане вредности латенце експерименталне (леве) и контролне (десне) стране код обе подгрупе, односно вредности латенце експерименталне (леве) стране пре индуковане повреде нерва могу се приказати као вредности контролне стране.

4.2.1.1.Одређивање латенце пре секције нерва - подгрупа „А“

Вредности латенце у оквиру прве фазе (пре хируршки индуковане секција нерва) одређене су по групама за експерименталну (леву) и контролну (десну) страну подгрупе „А“ и приказане табеларно (Табела 4.1).

Табела 4.1. Латенца пре секције нерва (експериментална-лева и контролна-десна страна)
подгрупа „А“

Кунићи n=6	ГРУПЕ – вредности латенце (ms)							
	I		II		III		IV	
	Л	Д	Л	Д	Л	Д	Л	Д
1	1,61	1,64	1,70	1,63	1,61	1,60	1,56	1,56
2	1,52	1,57	1,65	1,61	1,53	1,51	1,48	1,49
3	1,63	1,57	1,56	1,59	1,51	1,49	1,45	1,49
4	1,55	1,56	1,52	1,58	1,64	1,58	1,52	1,56
5	1,51	1,48	1,71	1,70	1,47	1,56	1,58	1,49
6	1,63	1,61	1,52	1,52	1,52	1,63	1,70	1,63
Me	1,58	1,57	1,61	1,60	1,53	1,57	1,54	1,53

Л – лева-експериментална страна

Д – десна- контролна страна

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике је $H=2,687$, односно мања је од табличне вредности $H_t=7,815$ (из таблице Хи квадрат (χ^2) распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе, при задатом ризику $\alpha=0,05$), што иде у прилог нулте хипотезе (H_0) о једнакости медијана,

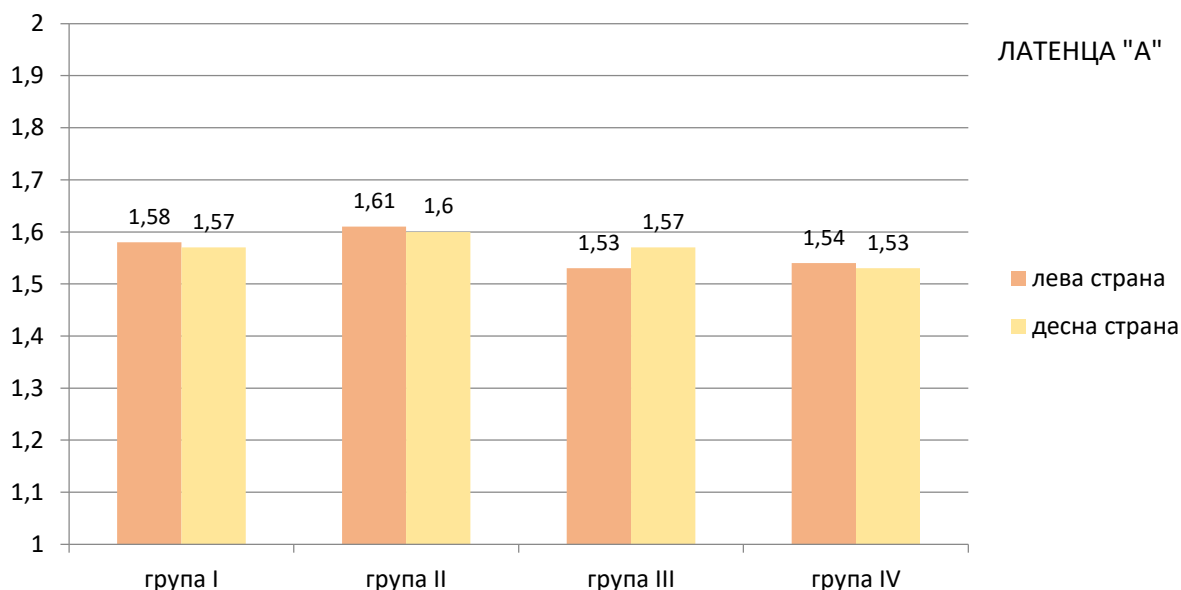
односно ефеката у свим групама. Латенца између група I, II, III и IV не показује значајне статистичке разлике у подгрупи „А“ (експериментална страна) ($p>0.05$).

У прилог закључку иду незнатне разлике у средњим вредностима (медијанама) између свих група подгрупе „А“ (Табела 4.1).

И за контролну страну (десни фацијални нерв) добијени су идентични статистички резултати. Латенца између група I, II, III и IV не показује значајне разлике у подгрупи „А“, што потврђују и врло мале разлике у средњим вредностима узорака на контролној страни ($p>0.05$).

На основу добијених резултата закључено је, да је средња вредност латенце код подгрупе „А“ ($Me=1,56$) идентична код обе (експериментална и контролна) стране.

У циљу боље прегледности сумирани су резултати вредности латенце пре хируршки индуковане секције нерва по групама за подгрупу „А“ обе стране (експериментална и контролна) и приказани графички (Графикон 4.2).



Графикон 4.2. Латенца у подгрупи "А", поређење средњих вредности експерименталне (леве) и контролне (десне) стране (ms)

На основу сумираних резултата закључено је, да средња вредност латенце пре хируршки индуковане повреде нерва за све групе подгрупе „А“, експерименталне и контролне стране је приближна, без статистичких значајности одступања посматраних параметара ($p>0.05$) (Графикон 4.2).

Овај податак у даљем току рада је био кључан у опредељењу тако, да у трећој фази експеримента није било потребно радити електрофизиолошка испитивања за контролну (леву) страну, већ је довољно било само упоређивати резултате експерименталне стране пре хируршки индуковане повреде нерва (здрав нерв) и након реконструкције (повређен нерв) у задатим временским интервалима посматрања (подгрупе „А“ и „Б“).

У наставку експеримента, експериментална (лева) страна пре индуковане секције нерва може се посматрати као контролна страна.

4.2.1.2. Одређивање латенце након рконструкције нерва - подгрупа „А“

Вредности латенце су одређене за сваку групу подгрупе „А“ шест недеља након спроведене реконструкције неком од наведених метода у оквиру треће фазе експеримента непосредно пре жртвовања животиња, како је већ наведено само за експерименталну(леву) страну (Табела 4.2).

Табела 4.2. Латенца након реконструкције нерва експериментална страна - подгрупа „А“

Кунићи n=6	ГРУПЕ- вредности латенце (ms)			
	I	II	III	IV
1	2,72	2,55	1,63	1,58
2	2,27	2,46	1,67	1,58
3	2,37	2,75	1,64	1,63
4	2,62	2,38	1,57	1,55
5	2,57	2,43	1,59	1,63
6	2,61	2,81	1,52	1,61
Me	2,59	2,51	1,61	1,60

Вредност статистике је $H=19,553$ знатно већа од граничне вредности $H_t=7,815$ (из таблице χ^2 тест распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при ризику $\alpha=0,05$) те се мора одбацити H_0 о једнакости ефеката између метода и констатовати, да постоји статистички значајна разлика у ефектима бар између две примењене методе.

Средње вредности латенце између група I, II, III и IV показују значајне разлике у подгрупи „А“, шест недеља након реконструкције нерва за експерименталну страну. (Табела 4.2).

Симултаним поређењем међу групама показало се између којих група постоји статистички значајна разлика, пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва у задатом временском интервалу (шест недеља) за експерименталну (леву) страну (Табела 4.3).

Табела 4.3. Поређење вредности латенце по групама подгрупе „А“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Латенца Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28, 50)					
	I – II	I – III	I – IV	II – III	II – IV	III – IV
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=19,553	Wa = 41 Wb = 37	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wa = 36 Wb = 42
$H_v=3, \alpha<7,815$	28<Wa<50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	28<Wb<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења спроведених метода између група I и II израчуната статистика теста $W_a=41$ искључује постојање статистички значајне разлике. У поређењу методе групе I са методама група III и IV статистика теста $W_b=57$ већа је од горњег критичног прага те је уз наведени ризик закључено, да се методама примењеним код група III и IV постижу значајно бољи резултати него методом код групе I ($p<0.05$) (Табела 4.3).

Исто тако, на основу статистике теста $W_b=57$ методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом код групе II ($p<0.05$). При поређењу група III и IV статистика теста $W_b=42$ показала је незнатну супериорност методе спроведене код групе IV у односу на групу III те се може закључити, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између ове две групе ($p>0.05$) (Табела 4.3).

4.2.1.3. Поређење вредности латенце по групама подгрупе „А“

Поређење вредности латенце у трећој фази експеримента спроведено је између скорова латенце добијених након реконструкције (експериментална група n_1) и скорова латенце добијених пре индуковане секције нерва (контролна група n_2), за леву (експерименталну) страну сваке групе посебно у оквиру подгрупе „А“ (Табеле 4.4, 4.5, 4.6, 4.7).

Табела 4.4. Поређење вредности латенце групе I након и пре секције нерва подгрупа „А“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Ме
I – након (n_1)	2,72	2,27	2,37	2,62	2,57	2,61	2,59
I - пре (n_2)	1,61	1,52	1,63	1,55	1,51	1,63	1,58

Полазећи од претпоставке дате са нултом хипотезом - H_0 (да нема разлике у ефектима) испитиван је горњи праг значајности желећи да се потврде очекивања дата са алтернативном хипотезом - H_1 , да су ефекти значајно бољи у првој фази у узорку пре индуковане секције нерва. За узорке величине $n_1=6$ и $n_2=6$ (n - број кунића) горња критична вредност W_b теста суме рангова износи 50 распон 28,50.

Како је израчуната статистика теста $W_b = 57,0$ већа од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha = 0,05$ може се закључити, да је примењеном методом код групе I латенца значајно боља у узорку пре индуковане секције нерва од узорка након реконструкције нерва, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n_2 , али и дескриптивна статистика, тј. велика разлика у медијанама: $Me_2 = 1,58$ а $Me_1 = 2,59$ (Табела 4.4).

Табела 4.5. Поређење вредности латенце групе II након и пре секције нерва подгрупе „А“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Ме
II – након (n_1)	2,55	2,46	2,75	2,38	2,43	2,81	2,51
II – пре (n_2)	1,70	1,65	1,56	1,52	1,71	1,52	1,61

Како је израчуната статистика теста $W_b = 57,0$ већа од горњег прага значајности то са ризиком $\alpha = 0,05$ је закључено да је примењеном методом код групе II латенца значајно боља у узорку пре индуковане секције од узорка након реконструкције нерва, што поткрепљује груписање најбољих ефеката у узорку n_2 , али и дескриптивна статистика, односно велика разлика у медијанама: $Me_2 = 1,61$ а $Me_1 = 2,51$ (Табела 4.5).

Табела 4.6. Поређење вредности латенце групе III након и пре секције нерва подгрупа „А“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
III – након (n_1)	1,63	1,67	1,64	1,57	1,59	1,52	1,61
III - пре (n_2)	1,61	1,53	1,51	1,64	1,47	1,52	1,53

Под истим претпоставкама датим са H_0 и H_1 као у претходним случајевима и за узорке величине $n_1 = n_2 = 6$ горња критична вредност W_b теста суме рангова износи 50 распон 28,50. Међутим, израчуната статистика теста $W_b = 48,0$ пала је у границама доњег и горњег прага те са ризиком $\alpha = 0,05$ не одбацује H_0 и закључује, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између узорака пре индуковане секције и након реконструкције нерва. Груписање најбољих ефеката, а тиме и рангова $W_b = 48$ видљиво је у узорку n_2 , али ипак недовољно да статистика теста прекорачи горњи праг значајности.

Разлика у ефектима се применом ове методе спроведене код групе III постепено губи, што потврђује и дескриптивна статистика, односно разлика у медијанама: $Me_2 = 1,53$, а $Me_1 = 1,61$ није велика (Табела 4.6).

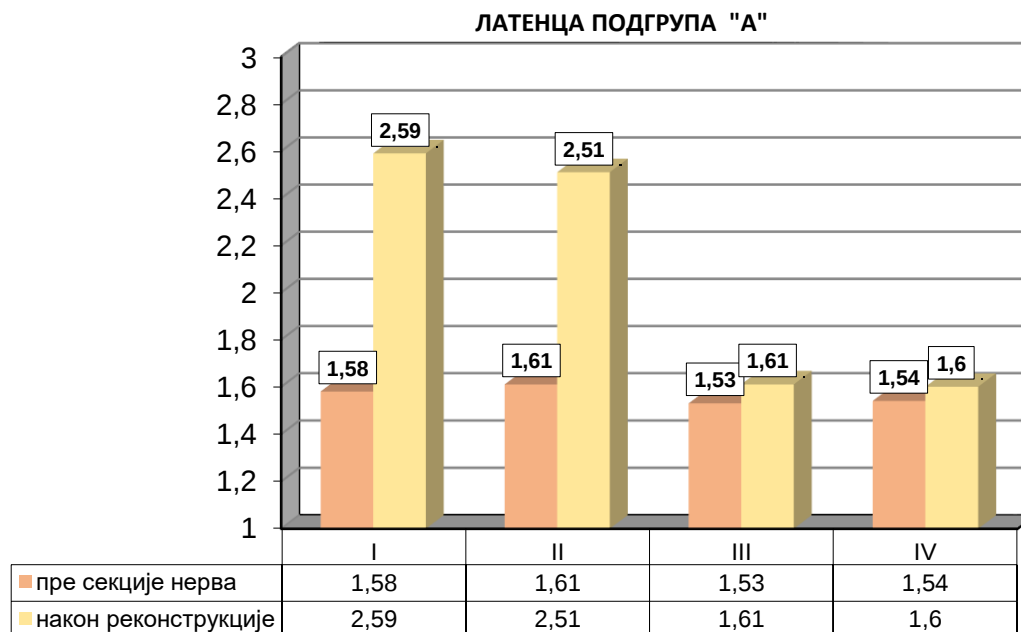
Детектовано је да су вредности латенце код групе III приближне у обе фазе експеримента.

Табела 4.7. Поређење вредности латенце групе IV након и пре секције нерва подгрупе „А“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
IV – након (n_1)	1,58	1,58	1,63	1,55	1,63	1,61	1,60
IV - пре (n_2)	1,56	1,48	1,45	1,52	1,58	1,70	1,54

И у овом случају као и у претходном израчуната статистика теста $W_b = 48,0$ је мања од горњег прага те са ризиком $\alpha = 0,05$ нема довољно разлога да се одбаци H_0 и може се закључити, да спроведеном методом код групе IV не постоји статистички значајна разлика у ефектима између узорака пре индуковане секције и након реконструкције нерва. Груписање најбољих рангова јесте видљиво у узорку n_2 , али недовољно да статистика теста прекорачи горњи праг значајности. Разлика у ефектима се смањује, што потврђује и дескриптивна статистика, тј. разлика у медијанама: $Me_2 = 1,54$, $Me_1 = 1,60$ није велика (Табела 4.7). И код IV групе вредности латенце пре секције и након реконструкције се подударају.

Средње вредности латенце по групама, пре хируршки индуковане секције и шест недеља након реконструкције нерва (подгрупа „А“) су сумиране и приказане графички (Графикон 4.3).



Графикон 4.3. Латенца - поређење ефеката (средњих вредности) подгрупе „А“ пре секције и након реконструкције нерва (ms)

На основу изнетих података може се закључити, да су методе реконструкције спроведене код група III и IV знатно супериорније од метода I и II (Графикон 4.3), на шта указују вредности латенце које се у периоду шест недеља након репарације нерва враћају у оквиру референтних вредности добијених пре хируршки индуковане секције нерва (Графикон 4.2).

4.2.1.4. Одређивање латенце пре секције нерва - подгрупа „Б“

Идентичним методама примењеним код подгрупе „А“ је израчуната вредност латенце у оквиру прве фазе експеримента и код свих група подгрупе „Б“ за експерименталну (леву) и контролну (десну) страну (Табела 4.8).

Табела 4.8. Латенца пре секције нерва (експериментална и контролна страна) подгрупа „Б“

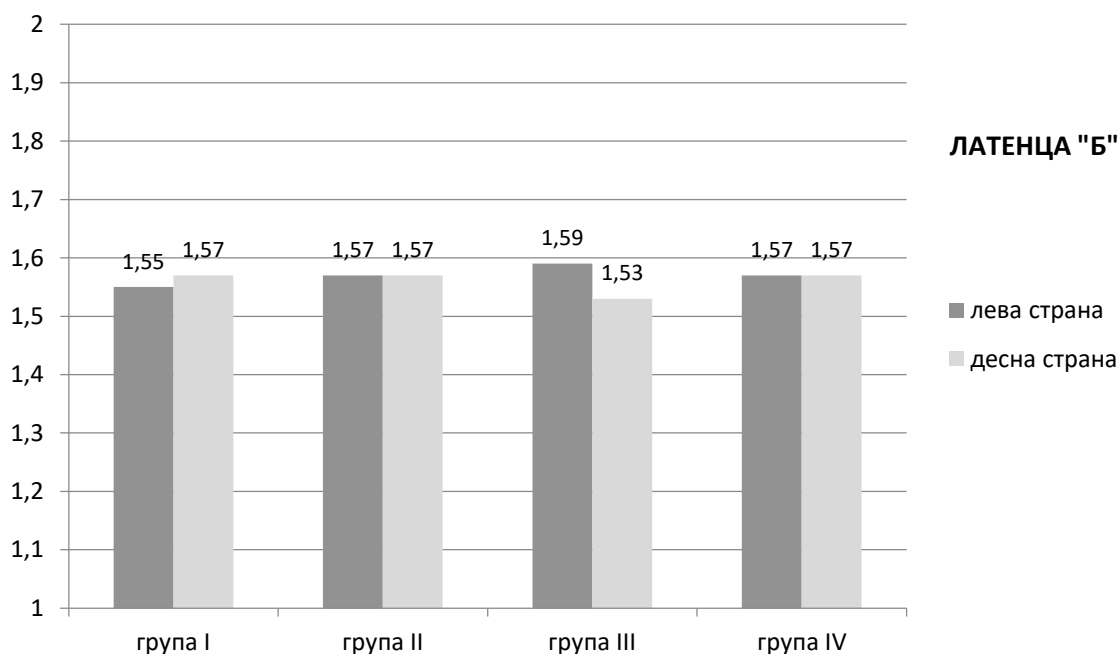
Кунићи n=6	ГРУПЕ – вредности латенце (ms)							
	I		II		III		IV	
	Л	Д	Л	Д	Л	Д	Л	Д
1	1,56	1,67	1,64	1,71	1,53	1,49	1,60	1,55
2	1,54	1,56	1,48	1,48	1,61	1,60	1,51	1,49
3	1,67	1,57	1,57	1,49	1,59	1,56	1,59	1,58
4	1,71	1,63	1,56	1,58	1,58	1,49	1,58	1,61
5	1,49	1,52	1,57	1,61	1,49	1,48	1,56	1,49
6	1,54	1,52	1,61	1,55	1,70	1,70	1,55	1,61
Ме	1,55	1,57	1,57	1,57	1,59	1,53	1,57	1,57

Л - лева-експериментална страна

Д - десна-контролна страна

Латенца између посматраних група експерименталне и контролне стране не показује значајне разлике у подгрупи „Б“. Уочава се врло мала разлика у средњим вредностима између група у размаку од 0,04 ms што је статистички занемарљиво (Табела 4.8).

Сумирани скорови латенце обе стране подгрупе „Б“ пре секције нерва приказани су графички (Графикон 4.4).



Графикон 4.4. Латенца у подгрупи "Б", поређење средњих вредности експерименталне (леве) и контролне (десне) стране (ms)

Упоредивањем средњих вредности експерименталне и контролне стране пре индуковане секције нерва код подгрупе „Б“ нема значајних статистичких одступања у параметрима посматрања.

На основу наведених резултата у првој фази експеримента о подударности вредности латенце код експерименталне и контролне стране у наставку посматрања задатих параметара није било потребно радити додатна испитивања за контролну страну код обе подгрупе, тако да референтне вредности амплитуде представљају мерења добијена код експерименталне (леве) стране пре индуковане секције нерва (здрав нерв). У наставку експеримента лева страна пре индуковане секције нерва је третирана као контролна страна.

4.2.1.5. Одређивање латенце након рконструкције нерва - подгрупа „Б“

Вредности латенце експерименталне стране одређене су поређењем група у оквиру треће фазе експеримента осам недеља након реконструкције нерва код подгрупе „Б“ и приказане табеларно (Табела 4.9).

Табела 4.9. Латенца након реконструкције нерва експериментална страна подгрупа „Б“

Кунићи n=6	ГРУПЕ- вредности латенце (ms)			
	I	II	III	IV
1	2,15	2,33	1,61	1,58
2	2,29	2,37	1,62	1,54
3	2,14	2,47	1,55	1,54
4	2,39	2,43	1,56	1,56
5	2,01	2,13	1,56	1,56
6	2,17	2,36	1,62	1,58
Me	2,16	2.37	1,59	1,56

Вредност статистике је $H=18,373$ знатно је већа од граничне вредности $H_{\alpha}=7,815$ (из таблице χ^2 тест распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при ризику $\alpha = 0,05$) те се мора одбацити H_0 о једнакости ефеката између метода и прихватити H_1 , да постоји статистички значајна разлика у ефектима између две примењене методе. Вредности латенце између група I, II, III и IV показују значајне разлике у подгрупи „Б“, након реконструкције нерва код експерименталне стране (Табела 4.9).

Симултаним поређењем израчунат је скор између којих група постоји сатистчки значајна разлика пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва. Добијени резултати су приказани табеларно (Табела 4.10).

Табела 4.10. Поређење вредности латенце по групама подгрупе „Б“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Латенца Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28, 50)					
	I – II	I – III	I – IV	II – III	II – IV	III – IV
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
$H=18,373$	Wa = 47 Wb = 31	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wa = 31 Wb = 47
$H_{\alpha}=7,815$	$28 < Wa < 50$	$Wb > 50$	$Wb > 50$	$Wb > 50$	$Wb > 50$	$28 < Wb < 50$
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења метода спроведених код група I и II израчуната статистика теста $W_a = 47$ није већа од горњег прага значајности, што искључује постојање статистички значајне разлике. У поређењу методе код групе I са методама група III и IV статистика теста $W_b = 57$ већа је од горњег критичног прага те уз наведени ризик закључујемо, да се методама примењеним код група III и IV постижу знатно бољи резултати него методом код групе I. Исто тако, на основу статистике теста $W_b = 57$ методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом код групе II.

При поређењу метода код група III и IV статистика теста $W_b = 47$ која је близу горњег прага указује на извесну супериорност методе групе IV у односу на групу III. Ипак, то није довољно за одбацивање H_0 те је закључено, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између ове две групе ($p > 0.05$) (Табела 4.10).

Након приказа појединачних резултата латенце и поређења истих међу групама одређене су вредности латенце пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва између истих група.

4.2.1.6. Поређење вредности латенце по групама подгрупе „Б“

И у оквиру подгрупе „Б“ упоређени су скорови латенце након реконструкције (експериментална страна n_1) и пре хируршки индукована секција (контролна страна n_2) нерва између сваке групе посебно и приказани табеларно (Табеле 4.11 ; 4.12 ; 4.13 ; 4.14).

Табела 4.11. Поређење вредности латенце након и пре секције нерва, групе I подгрупе „Б“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
I – након (n_1)	2,15	2,29	2,14	2,39	2,01	2,17	2,16
II- пре (n_2)	1,56	1,54	1,67	1,71	1,49	1,54	1,55

Како је израчуната статистика теста $W_b = 57,0$ већа од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ закључено је, да је латенца применом методе код групе I значајно боља у узорку пре индуковане секције од узорка након реконструкције нерва, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n_2 , али и дескриптивна статистика, односно велика разлика у медијанама: $Me_2 = 1,55$ а $Me_1 = 2,16$ (Табела 4.11).

Табела 4.12. Поређење вредности латенце након и пре секције нерва, групе II - „Б“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
II – након (n_1)	2,33	2,37	2,47	2,43	2,13	2,36	2,37
II- пре (n_2)	1,64	1,48	1,57	1,56	1,57	1,61	1,57

Као и у претходном случају примећено је да су вредности латенце код групе II ниже у узорку пре индуковане секције нерва од узорка након реконструкције, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n_2 (пре индуковане секције нерва), али и дескриптивна статистика, односно велика разлика у медијанама: $Me_2 = 1,57$, а $Me_1 = 2,37$ (Табела 4.12).

Табела 4.13. Поређење вредности латенце након и пре секције нерва групе III - „Б“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
III – након (n1)	1,61	1,62	1,55	1,56	1,56	1,62	1,59
III – пре (n2)	1,53	1,61	1,59	1,58	1,49	1,70	1,59

Како је израчуната статистика теста $W_b = 41,5$ пала између горње и доње границе, односно мања је од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha=0,05$ нема довољно разлога да се одбаци H_0 те је закључено, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између узорака пре хируршки индукована секција и након реконструкције нерва. Груписање нешто бољих рангова видљиво је у узорку n2, али недовољно да статистика теста прекорачи горњи праг значајности.

Разлика у медијанама не постоји: $Me_2 = 1,59$, а $Me_1 = 1,59$, аритметичке средине се разликују за свега 0,01 ms (Табела 4.13).

На основу наведеног да се закључити да су вредности амплитуде код групе III осам недеља након реконструкције нерва идентичне са референтним вредностима амплитуде пре индуковане секције нерва, што промовише успешност ове методе реконструкције на основу наведеног параметра посматрања.

Табела 4.14. Поређење вредности латенце након и пре секције нерва групе IV - „Б“

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
IV - након (n1)	1,58	1,54	1,54	1,56	1,56	1,58	1,56
IV – пре (n2)	1,60	1,51	1,59	1,58	1,56	1,55	1,57

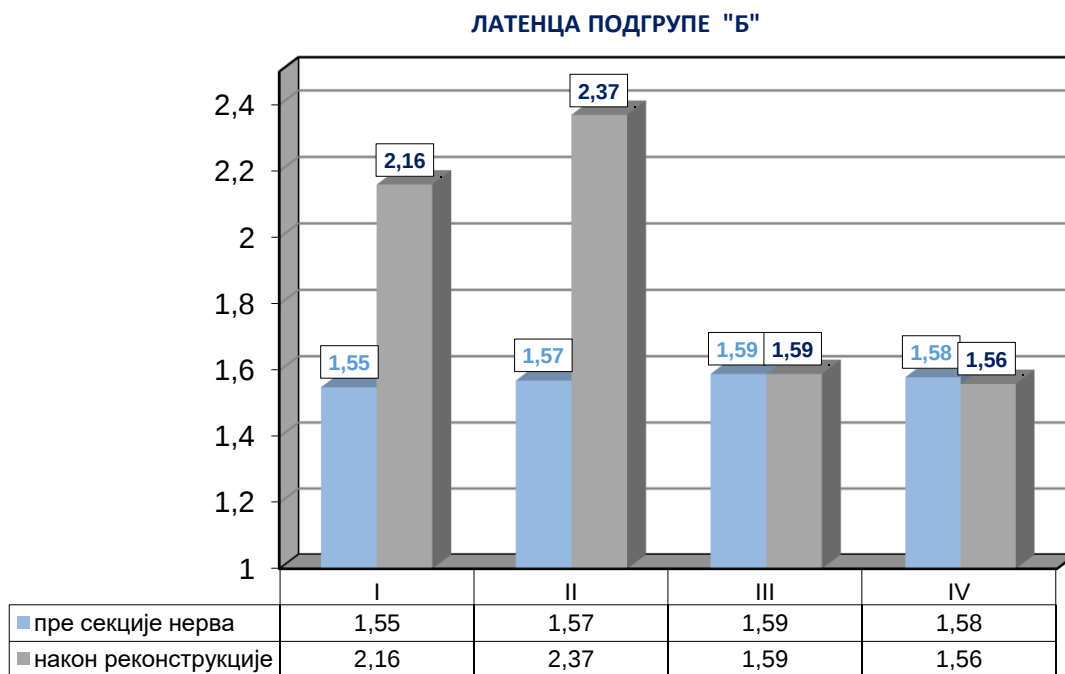
Израчуната статистика теста $W_b = 35,0$ налази се између доње и горње границе (мања од горњег прага) те са ризиком $\alpha = 0,05$ нема довољно разлога за одбацивањем H_0 . Закључено је, да применом методе код групе IV не постоји статистички значајна разлика у ефектима између узорака пре индуковане секције и након реконструкције нерва ($p>0.05$).

У овом случају груписање најбољих рангова (бољи ефекти) нашло се у узорку n1 - након реконструкције $W_a = 43$, али недовољно да његова сума рангова - статистика прекорачи горњи праг значајности.

Разлика у медијанама је минорна: $Me_2 = 1,57$, а $Me_1 = 1,56$ (Табела 4.14). Примењена метода реконструкције у IV групи на основу вредности амплитуде сугерише на оправданост примене исте у процесу неурорегенерације.

Разлике скорова између III и IV групе су минорне, мада су медијане нешто веће у групи III, али статистички недовољно, да би приказале разлике у вредностима параметара посматрања ($p>0.05$).

Средње вредности латенце по групама пре хируршки индуковане секције и осам недеља након реконструкције нерва су сумиране и приказане графички (Графикон 4.5).



Графикон 4.5. Латенца - поређење ефеката (средњих вредности) пре секције и након реконструкције нерва (ms)

Сумирани резултати вредности латенце код подгрупе „Б“ указују на супериорност методе спроведене код групе III где је као материјал у циљу репарације повређеног нерва употребљен PRP. На основу задатих параметара посматрања закључено је, да су скорови латенце по групама обе подгрупе највећи код група III и IV.

Укупни скорови вредности латенце код подгрупе „А“ ($M = 1,56$) идентични су скоровим латенце подгрупе „Б“ ($M=1,56$), код експерименталне и контролне стране у првој фази експеримента (Графикони 4.2 ; 4.4).

Приликом упоређивања средњих вредности пре и након реконструкције нерва добијених код подгрупа „А“ и „Б“ (Графикони 4.3 ; 4.5) уочава се, да нема статистички значајне разлике у временском опсегу параметара посматрања, дакле период од шест недеља (подгрупа „А“) се може навести као оптималан за процес регенерације фацијалног нерва на основу података добијених анализом скорова латенце (Графикон 4.3).

4.2.2. ОДРЕЂИВАЊЕ БРЗИНЕ ПРОВОДЉИВОСТИ ФАЦИЈАЛНОГ НЕРВА

Брзина нервне проводљивости (BNP) представља брзину којом електрични импулс пролази дуж нерва, израчунава се као количник разлике пређеног пута (растојање између два мерна места- P) и разлике латенце (L) за та два мерна места (места стимулације), изражава се као метар у секунди (*m/sec*). Заједно са латенцом и амплитудом представља један од основних електрофизиолошких параметара у процени нервне активности и функције мимичних мишића лица.

Брзина нервне проводљивости је израчуната у првој (пре хируршки индуковане секције) и трећој (након реконструкције нерва) фази експеримента у задатом временском опсегу посматрања од шест (подгрупа „А“), односно осам (подгрупа „Б“) недеља.

Брзина нервне проводљивости је израчуната за обе (експериментална и контролна) стране у првој фази експеримента и само за експерименталну страну у трећој фази експеримента.

Пређени пут између два стимулуса је измерен код сваког кунића у све четири групе у обе подгрупе на обе (експериментална и контролна) стране.

Након израчунавања пређеног пута за сваког кунића обострано добијене вредности су подељене са вредностима претходно одређене разлике латенце два мерна места код подгрупе „А“, пре хируршки индуковане секције нерва за експерименталну и контролну страну (Табеле 4.15, 4.16) и након реконструкције нерва за експерименталну страну (Табела 4.23), као и код подгрупе „Б“, пре хируршки индуковане секције нерва за експерименталну и контролну страну (Табеле 4.19, 4.20) и након реконструкције за експерименталну страну (Табела 4.24).

Као и приликом одређивања латенце у трећој фази експеримента мерења су спроведена само за леву (експерименталну) страну јер је утврђено, да су референтне вредности пре хируршки индуковане секције нерва за обе стране (експериментална-лева, контролна – десна) готово идентичне, дакле лева експериментална страна пре индуковане повреде нерва третирана је као контролна страна.

Добијене вредности нервне проводљивости изражене су у метар /секунди (*m/sec*).

Све вредности по подгрупама пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва приказане су табеларно.

4.2.2.1. Одређивање брзине нервне проводљивости пре секције нерва - подгрупа „А“

У првој фази експеримента пре хируршки индуковане секције нерва одређена је брзина нервне проводљивости (BNP) свих група код подгрупе „А“ за експерименталну (лева) и контролну (десна) страну по задатом протоколу (Табеле 4.15, 4.16).

Табела 4.15. Одређивање брзине нервне проводљивости код подгрупе „А“ пре индуковане секције нерва експериментална (лева) страна

Број кунића	ГРУПЕ (подгрупа „А“) лева страна											
	I			II			III			IV		
	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L
1	38,01	61,2	1,61	36,76	62,5	1,70	39,00	62,8	1,61	39,29	61,3	1,56
2	39,86	60,6	1,52	38,00	62,7	1,65	41,11	62,9	1,53	41,28	61,1	1,48
3	37,11	60,5	1,63	39,87	62,2	1,56	40,79	61,6	1,51	41,79	60,6	1,45
4	39,22	60,8	1,55	39,21	59,6	1,52	37,98	62,3	1,64	39,86	60,6	1,52
5	41,52	62,7	1,51	37,25	63,7	1,71	42,04	61,8	1,47	39,36	62,2	1,58
6	38,22	62,3	1,63	41,97	63,8	1,52	39,60	60,2	1,52	37,58	63,9	1,70

BNP - брзина нервне проводљивости (m/sec)

P - пређени пут (mm)

L - латенца (ms)

Табела 4.16. Одређивање брзине нервне проводљивости код подгрупе „А“ пре индуковане секције нерва контролна (десна) страна

Број кунића	ГРУПЕ (подгрупа „А“) десна страна											
	I			II			III			IV		
	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L
1	37,86	62,1	1,64	37,11	60,5	1,63	39,75	63,6	1,60	38,46	60,0	1,56
2	40,00	62,8	1,57	39,44	63,5	1,61	40,33	60,9	1,51	40,46	60,3	1,49
3	38,85	61,0	1,57	39,11	62,2	1,59	41,00	61,1	1,49	40,46	60,3	1,49
4	39,80	62,1	1,56	38,54	60,9	1,58	39,87	63,0	1,58	39,29	61,3	1,56
5	41,28	61,1	1,48	37,64	64,0	1,70	39,42	61,5	1,56	40,46	60,3	1,49
6	39,31	63,3	1,61	41,97	63,8	1,52	37,11	60,5	1,63	37,11	60,5	1,63

BNP - брзина нервне проводљивости (m/sec)

P - пређени пут (mm)

L - латенца (ms)

У даљем поступку анализирана је вредност брзине нервне проводљивости по групама на основу *Kruskal-Wallis-ov* теста више независних узорака за подгрупу „А“ пре хируршки индуковане секције нерва за експерименталну и контролну страну (Табеле 4.17, 4.18)

Табела 4.17. *Kruskal-Wallis-ov* тест утврђивања статистички значајне разлике у погледу брзине нервне проводљивости међу групама у подгрупи „А“ - експериментална страна

Кунић	МЕТОД (по групама) -РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	37,11	2	36,76	1	37,98	5	37,58	4
2	38,01	7	37,25	3	39,00	9	39,29	12
3	38,22	8	38,00	6	39,60	14	39,36	13
4	39,22	11	39,21	10	40,79	18	39,86	15,5
5	39,86	15,5	39,87	17	41,11	19	41,28	20
6	41,52	21	41,97	23	42,04	24	41,79	22
Ti	233,94	64,5	233,06	60	240,52	89	239,16	86,5
H =	2,212							
Me	38,72		38,61		40,20		39,61	

Табела 4.18. *Kruskal-Wallis-ov* тест утврђивања статистички значајне разлике у погледу брзине нервне проводљивости међу групама у подгрупи „А“ – контролна страна

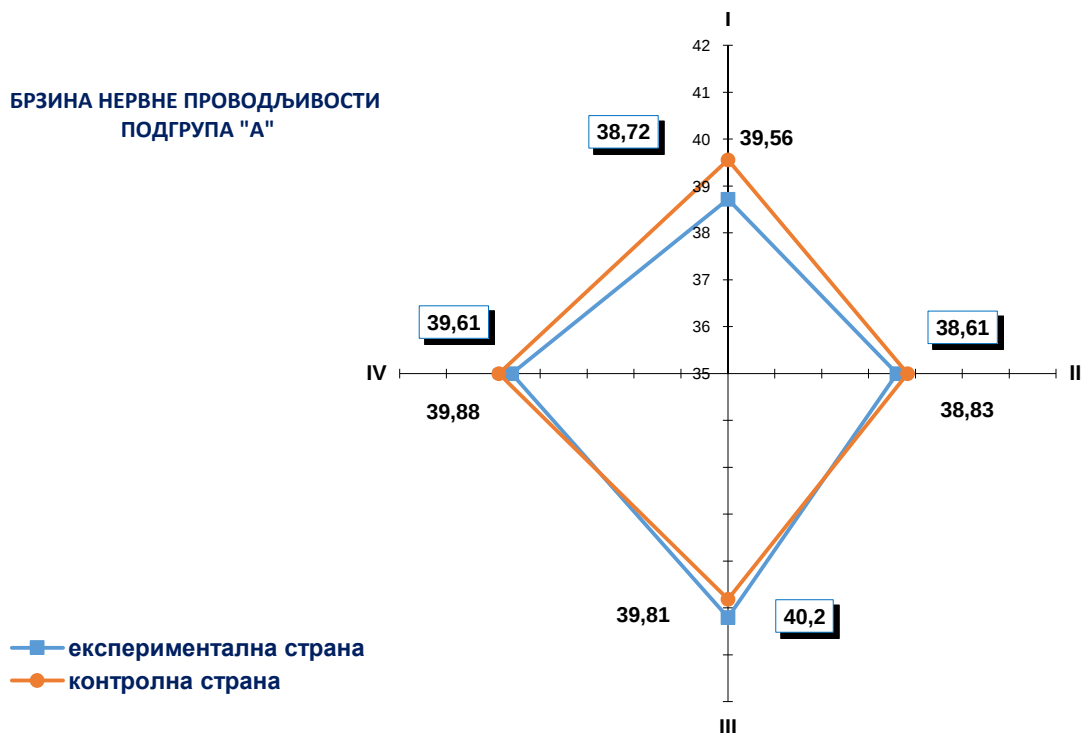
Кунић	МЕТОД (по групама) - РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	37,86	5	37,11	2	37,11	2	37,11	2
2	38,85	8	37,64	4	39,42	12	38,46	6
3	39,31	11	38,54	7	39,75	14	39,29	10
4	39,80	15	39,11	9	39,87	16	40,46	20
5	40,00	17	39,44	13	40,33	18	40,46	20
6	41,28	23	41,97	24	41,00	22	40,46	20
Ti	237,1	79	233,81	59	237,48	84	236,24	78,00
H =	1,207							
Me	39,56		38,83		39,81		39,88	

Израчуната вредност *Kruskal-Wallisove* статистике $H=1,207$ је мања од табличне вредности $H_{\alpha}=7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе, при задатом ризику $\alpha=0,05$). Стога, није могуће одбацити H_0 о једнакости средњих вредности, односно ефеката између примењених метода.

У овом експерименту у подгрупи „А“ не постоји статистички значајна разлика у брзини нервне проводљивости између група када су у питању експериментална и контролна страна. Обзиром на резултат овог теста није потребно *Mann-Whitny-Wilcoxon-ov* тестом тражити разлике између парова код група I, II, III и IV.

У прилог овог закључка иде блискост средњих вредности – медијана (Ме).

Добијене средње вредности подгрупе „А“ експерименталне и контролне стране су сумиране и графички приказане (Графикон 4.6).



Графикон 4.6. Поређење скорова брзине нервне проводљивости међу групама у подгрупи „А“, експерименталне (лева) и контролне (десна) стране (m/sec)

На радар дијаграму ефеката у погледу брзине нервне проводљивости у простору по групама уочава се, да су измерене вредности експерименталне и контролне стране врло блиске (разлике су мање од једне милисекунде у свим групама), што говори у прилог закључка, да не постоји статистички значајна разлике у резултатима експерименталне и контролне стране подгрупе „А“ пре индуковане хируршке повреде нерва.

Како су добијене вредности сугерисале на незнатну разлику у брзини нервне проводљивости експерименталне и контролне стране у првој фази експеримента, односно пре хируршки индуковане секције нерва у трећој фази експеримента одређиване су вредности нервне проводљивости само за експерименталну страну.

4.2.2.2. Одређивање брзине нервне проводљивости пре секције нерва - подгрупа „Б“

Као и код подгрупе „А“ истим методама израчунате су вредности брзине нервне проводљивости за све групе подгрупе „Б“ пре хируршки индуковане секције нерва за експерименталну и контролну страну (Табеле 4.19, 4.20).

Табела 4.19. Одређивање брзине нервне проводљивости код подгрупе „Б“ пре индуковане секције нерва експериментална (лева) страна

Број кунића	ГРУПЕ (подгрупа „Б“) лева страна											
	I			II			III			IV		
	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L
1	38,46	60,0	1,56	37,86	62,1	1,64	40,19	61,5	1,53	39,75	63,6	1,60
2	39,54	60,9	1,54	41,21	61,0	1,48	39,44	63,5	1,61	40,33	60,9	1,51
3	38,08	63,6	1,67	40,00	62,8	1,57	39,11	62,2	1,59	37,98	60,4	1,59
4	37,19	63,6	1,71	39,80	62,1	1,56	38,54	60,9	1,58	39,87	63,0	1,58
5	40,46	60,3	1,49	38,91	61,1	1,57	41,00	61,1	1,49	39,42	61,5	1,56
6	40,00	61,6	1,54	39,31	63,3	1,61	37,64	64,0	1,70	40,64	63,0	1,55

BNP - брзина нервне проводљивости (m/sec)

P - пређени пут (mm)

L - латенца (ms)

Табела 4.20. Одређивање брзине нервне проводљивости код подгрупе „Б“ пре индуковане секције нерва контролна (десна) страна

Број кунића	ГРУПЕ (подгрупа „Б“) десна страна											
	I			II			III			IV		
	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L
1	38,08	63,6	1,67	37,19	63,6	1,71	41,00	61,1	1,49	40,64	63,0	1,55
2	39,80	62,1	1,56	41,28	61,1	1,48	39,75	63,6	1,60	40,46	60,3	1,49
3	38,85	61,0	1,57	40,46	60,3	1,49	39,80	62,1	1,56	38,54	60,9	1,58
4	37,11	60,5	1,63	39,87	63,0	1,58	40,46	60,3	1,49	39,31	63,3	1,61
5	41,97	63,8	1,52	39,31	63,3	1,61	41,21	61,0	1,48	41,01	61,1	1,49
6	39,86	60,6	1,52	40,64	63,0	1,55	37,58	63,9	1,70	39,44	63,5	1,61

BNP - брзина нервне проводљивости (m/sec)

P - пређени пут (mm)

L - латенца (ms)

Анализиране су вредности брзине нервне проводљивости на основу *Kruskal-Wallis-ovog* теста више независних узорака по групама за подгрупу „Б“ пре хируршки индуковане секције нерва за експерименталну и контролну страну (Табеле 4.21, 4.22).

Табела 4.21. *Kruskal-Wallis* -ов тест утврђивања статистички значајне разлике у погледу брзине нервне проводљивости међу групама у подгрупи „Б“ - експериментална страна

Кунић	МЕТОД (по групама) – РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	37,19	1	37,86	3	37,64	2	37,98	4
2	38,08	5	38,91	8	38,54	7	39,42	11
3	38,46	6	39,31	10	39,11	9	39,75	14
4	39,54	13	39,80	15	39,44	12	39,87	16
5	40,00	17,5	40,00	17,5	40,19	19	40,33	20
6	40,46	21	41,21	24	41,00	23	40,64	22
Ti	233,73	63,5	237,09	77,5	235,92	72	237,99	87
H =	0,972							
Me	39,00		39,56		39,28		39,81	

Како је израчуната вредност *Kruskal-Wallis*ове статистике $H = 0,972$ мања од прага значајности - табличне вредности $H_t = 7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при задатом ризику $\alpha = 0,05$) то не можемо одбацити H_0 о једнакости медијана, односно у овом експерименту (подгрупи „Б“) не постоји статистички значајна разлика у брзини нервне проводљивости међу групама када је експериментална страна у питању.

У прилог овог закључка иде блискост средњих вредности – медијана (Me) (Табела 4.21).

Обзиром на резултат овог теста, када је израчуната статистика мања од граничне вредности није било потребно *Mann-Whitney-Wilcoxon*-ов тестом тражити разлике између парова група I, II, III и IV.

Табела 4.22. *Kruskal-Wallis* -ов тест утврђивања статистички значајне разлике у погледу брзине нервне проводљивости међу групама у подгрупи „Б“ - контролна страна

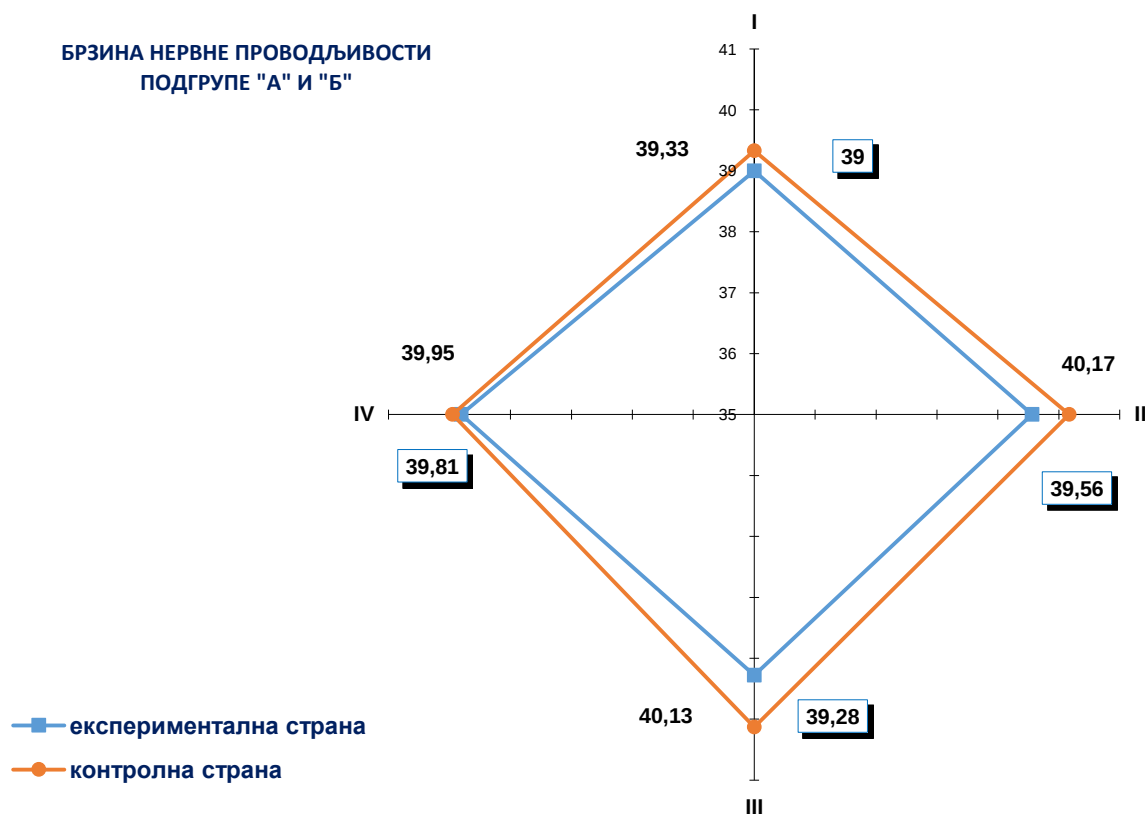
Кунић	МЕТОД (по групама) - РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	37,11	1	37,19	2	37,58	3	38,54	5
2	38,08	4	39,31	7,5	39,75	10	39,31	7,5
3	38,85	6	39,87	14	39,80	11,5	39,44	9
4	39,80	11,5	40,46	16	40,46	16	40,46	16
5	39,86	13	40,64	18,5	41,00	20	40,64	18,5
6	41,97	24	41,28	23	41,21	22	41,01	21
Ti	235,67	59,5	238,75	81	239,80	82,5	239,4	77
H =	1,122							
Me	39,33		40,17		40,13		39,95	

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis*-ове статистике $H=1,122$ мања је од табличне вредности $H_t=7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при задатом ризику $\alpha = 0,05$). Дакле, не можемо одбацити H_0 о једнакости средњих вредности, односно ефеката између посматраних група.

Односно, у овом експерименту у подгрупи „Б“ не постоји статистички значајна разлика у брзини нервне проводљивости између група када је контролна страна у питању. Обзиром на резултат овог теста, када је израчуната статистика мања од граничне вредности није потребно тражити разлике између парова група I, II, III и IV.

У прилог овог закључка иде блискост средњих вредности – медијана (Табела 4.22).

Добијене средње вредности брзине нервне проводљивости пре хируршки индуковане секција нерва подгрупе „Б“ на експерименталној и контролној страни сумиране су и приказане графички (Гарфикон 4.7).



Графикон 4.7. Поређење ефеката примењених метода у подгрупи „Б“, експерименталне (лева) и контролне (десна) стране у погледу брзине нервне проводљивости (m/sec)

На радар дијаграму ефеката у погледу брзине нервне проводљивости у простору примењених метода по групама уочава се, да су измерене вредности експерименталне и контролне стране врло блиске незнатно веће на контролној страни, али мање од једне милисекунде у свим групама што говори у прилог закључка, да не постоје статистички значајне разлике у резултатима леве и десне стране.

Овај податак је био смерница у даљем наставку експеримента, када је у питању брзина нервне проводљивости упоређиване су само вредности експерименталне стране између група пре хируршки индуковане секције нерва и након реконструкције у задатом временском интервалу (подгрупе „А“ и „Б“). Односно, експериментална страна пре секције нерва третирана је као контролна страна док је експериментална страна након секције нерва представљала експерименталну страну.

4.2.2.3. Одређивање брзине нервне проводљивости - подгрупе „А“ и „Б“ након секције нерва (експериментална страна)

У трећој фази експеримента одређена је по наведеним методама брзина нервне проводљивости код свих група подгрупа „А“ и „Б“ у задатом временском периоду посматрања (шест и осам недеља), само за експерименталну страну.

Добијене вредности су табеларно приказане (Табела 4.23, 4.24).

Табела 4.23. Одређивање брзине нервне проводљивости код подгрупе „А“ након реконструкције нерва - експериментална (лева) страна

Бој кунџа	ГРУПЕ (подгрупа „А“) лева страна											
	I			II			III			IV		
	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L
1	22,50	61,2	2,72	24,50	62,5	2,55	38,52	62,8	1,63	39,79	61,3	1,58
2	26,69	60,6	2,27	25,48	62,7	2,46	37,66	62,9	1,67	38,67	61,1	1,58
3	25,52	60,5	2,37	22,61	62,2	2,75	37,56	61,6	1,64	37,17	60,6	1,63
4	23,20	60,8	2,62	25,04	59,6	2,38	39,68	62,3	1,57	39,09	60,6	1,55
5	24,39	62,7	2,57	26,21	63,7	2,43	38,86	61,8	1,59	38,15	62,2	1,63
6	23,86	62,3	2,61	22,70	63,8	2,81	37,86	60,2	1,52	39,68	63,9	1,61

Табела 4.24. Одређивање брзине нервне проводљивости код подгрупе „Б“ након реконструкције нерва - експериментална (лева) страна

Број кунџа	ГРУПЕ (подгрупа „Б“) лева страна											
	I			II			III			IV		
	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L	BNP	P	L
1	27,90	60,0	2,15	26,65	62,1	2,33	38,19	61,5	1,61	40,25	63,6	1,58
2	26,59	60,9	2,29	25,73	61,0	2,37	39,19	63,5	1,62	39,54	60,9	1,54
3	29,71	63,6	2,14	25,42	62,8	2,47	40,12	62,2	1,55	39,22	60,4	1,54
4	26,61	63,6	2,39	25,55	62,1	2,43	39,03	60,9	1,56	40,38	63,0	1,56
5	30,00	60,3	2,01	28,68	61,1	2,13	39,16	61,1	1,56	39,42	61,5	1,56
6	28,38	61,6	2,17	26,82	63,3	2,36	39,50	64,0	1,62	39,87	63,0	1,58

BNP - брзина нервне проводљивости (m/sec)

P - пређени пут (mm)

L - латенца (ms)

Даљим статистичким методама (*Kruskal-Wallis-ov* тест) упоређени су скорови брзине нервне проводљивости по групама у подгрупи „А“ (Табела 4.25).

Табела 4.25. *Kruskal-Wallis -ov* тест утврђивања статистички значајне разлике у ефектима методе у погледу брзине нервне проводљивости након реконструкције нерва у подгрупи „А“ - експериментална страна

Кунић	МРТОД (по групама) - РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	26,69	12	26,21	11	39,68	22,5	39,79	24
2	25,52	10	25,48	9	38,86	20	39,68	23
3	24,39	6	25,04	8	38,52	18	39,09	21
4	23,86	5	24,50	7	37,86	16	38,67	19
5	23,20	4	22,70	3	37,66	15	38,15	17
6	22,50	1	22,61	2	37,56	14	37,17	13
Ti	146,16	38	146,54	40	230,14	105,5	232,55	117
H =	17,878							
Me	24,13		24,77		38,19		38,88	

Пошто је израчуната вредност *Kruskal-Wallisove* статистике $H=17,878$ већа од прага значајности - табличне вредности $H_t=7,878$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при задатом ризику $\alpha = 0,05$) мора се одбацити H_0 о једнакости медијана, тј. ефеката у свим примењеним методама, односно у овом експерименту постоји статистички значајна разлика у брзини нервне проводљивост у подгрупи „А“, која се може приписати некој од метода након реконструкције нерва, када је експериментална страна у питању. Следећи део статистичке обраде односио се на упоређивање група подгрупе „А“ међу собом (Табела 4.26).

Табела 4.26. Симултано поређење група I, II, III и IV након реконструкције нерва у подгрупи "А".

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Брзина нервне проводљивости Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28, 50)					
	I – II	I – III	I – IV	II – III	II – IV	III – IV
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=17,878	Wb = 39	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 44,5
$H_v=3, \alpha<7,815$	28<Wb<50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	28<Wb<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења метода код група I и II израчуната статистика теста $W_b=39$ искључује постојање статистички значајне разлике. У поређењу методе групе I са методама групе III и IV статистика теста $W_b = 57$ већа је од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - significant level $\alpha = 0,05$ и узорцима једнаке величине $n_1= n_2 = 6$) те уз наведени ризик може се закључити, да се методама спроведеним код група III и IV постижу значајно бољи резултати него методом код групе I ($p<0.05$).

Исто тако, на основу статистике теста $W_b = 57$ методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом групе II ($p < 0.05$) док се при поређењу метода група III и IV статистика теста $W_b = 44,5$ нашла унутар интервала прагова значајности те се мора прихватити H_0 , да не постоји статистички значајна разлика у ефектима када се пореде ове методе ($p > 0.05$) (Табела 4.26).

Брзина нервне проводљивости одређена је и код група подгрупе „Б“ на претходно утврђен начин *Kruskal-Wallis-ov* тестом (Табела 4.27).

Табела 4.27. *Kruskal-Wallis -ov* тест утврђивања статистички значајне разлике у ефектима методе у погледу брзине нервне проводљивости након реконструкције нерва у подгрупи „Б“ - експериментална страна

Кунић	МЕТОД (по групама) - РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	27,90	17	26,65	19	38,19	12	40,25	2
2	26,59	21	25,73	22	39,19	9	39,54	5
3	29,71	14	25,42	24	40,12	3	39,22	8
4	26,61	20	25,55	23	39,03	11	40,38	1
5	30,00	13	28,68	15	39,16	10	39,42	7
6	28,38	16	26,82	18	39,50	6	39,87	4
Ti	169,19	101	158,85	121	235,19	51	238,68	27
H =	18,907							
Me	28,14		26,19		39,18		39,71	

Како је израчуната вредност *Kruskal-Wallisove* статистике $H=18,907$ већа од прага значајности - табличне вредности $H_t = 7,878$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при задатом ризику $\alpha = 0,05$) мора се одбацити H_0 о једнакости ефеката у свим примењеним методама, односно у овом експерименту постоји статистички значајна разлика у брзини нервне проводљивост у подгрупи “Б “ бар измђу две групе која се може приписати некој од метода реконструкције, када је експериментална страна у питању. Средње вредности брзине нервне проводљивости група III и IV знатно су веће од оних у групама I и II, односно постоји статистички значајна разлика међу наведеним групама ($p < 0.05$) (Табела 4.27).

Сумиране средње вредности брзине нервне проводљивости за све групе подгрупе „Б“ упоређене су међу собом и табеларно приказане (Табела 4.28).

Табела 4.28. Симултано поређење група I, II, III и IV, након реконструкције нерва у подгрупи "Б"- контролна страна

Крускал-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Брзина нервне проводљивости Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28, 50)					
	I – II H0: M2=M1 H1: M2>M1	I – III H0: M3=M1 H1: M3>M1	I – IV H0: M4=M1 H1: M4>M1	II – III H0: M3=M2 H1: M3>M2	II – IV H0: M4=M2 H1: M4>M2	III – IV H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=18,907	Wb = 29 Wa = 49	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 51
$H_v=3, \alpha < 7,815$	28<Wb<50 28<Wa<50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50
+	-	+	+	+	+	+

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења метода код група I и II израчуната статистика теста Wb = 29 искључује постојање статистички значајне разлике. Сума рангова у групи I је врло блиска горњој граници, али не у мери да се испољи статистичка значајност. У поређењу методе код групе I са методама група III и IV статистика теста Wb = 57 уз наведени ризик може се закључити, да се методама код група III и IV постижу значајно бољи резултати него методом групе I, односно постоји статистичка значајност разлике ($p<0.05$).

Исто тако, на основу статистике теста Wb = 57 методама група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом групе II ($p<0.05$).

При поређењу метода код група III и IV статистика теста Wb = 51 на самој горњој граници указује на незнатну супериорност методе групе IV у односу на групу III те се мора констатовати, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима у корист методе групе IV ($p>0.05$) (Табела 4.28).

У даљој статистичкој обради, да би се утврдила ефикасност примењених метода упоређивани су скорови брзине нервне проводљивости између сваке групе понаособ пре хируршки индуковане секције нерва (контролна страна-n1) и након реконструкције (експериментална страна-n2) нерва.

4.2.2.4. Поређење брзине нервне проводљивости међу групама подгрупе „А“

Након одређивања брзине нервне проводљивости код подгрупе „А“ у трећој фази експеримента пре хируршки индуковане секције (контролна страна n1) нерва и након реконструкције (експериментална страна n2) неком од претходно наведених метода спроведено је додатно испитивање поређења брзине нервне проводљивости, код свих група појединачно.

Вредности поређења скорова брзине нервне проводљивости међу групама подгрупе „А“ приказани су табеларно (Табеле 4.29; 4.30; 4.31; 4.32).

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе I пре индуковане повреде нерва (n1) и након реконструкције (n2) (Табела 4.29).

Табела 4.29. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе I подгрупе „ A“

Редни број	Здружене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	R/b	Подаци	Ранг
Узорак							
1	41,52		12,00		12	41,52	12
2	39,86		11,00		11	39,86	11
3	39,22		10,00		10	39,22	10
4	38,22		9,00		9	38,22	9
5	38,01		8,00		8	38,01	8
6	37,11		7,00		7	37,11	7
7		26,69		6,0	6	26,69	6
8		25,52		5,0	5	25,52	5
9		24,39		4,0	4	24,39	4
10		23,86		3,0	3	23,86	3
11		23,20		2,0	2	23,20	2
12		22,50		1,0	1	22,50	1
Суме рангова узорака:			57,0	21,0			
Медијане	38,72	24,13	Wa	Wb			
AS	38,99	24,36					

- $H_0 - Me_1 = Me_2$ - Нема разлике у ефектима тј. брзини нервне проводљивости – примењеном методе пре секције и након реконструкције нерва
- $H_1 - Me_1 > Me_2$ - Брзина нервне проводљивости пре секције значајно је боља од оне након реконструкције нерва
- Me_1 - Медијана узорка n1 пре секције нерва
- Me_2 - медијана узорка n2 након реконструкције нерва

Полазећи од претпоставке дате са H_0 испитује се горњи праг значајности желећи да се потврде очекивања дата са H_1 . За узорке величине $n_1 = 6$ и $n_2 = 6$ горња критична вредност W_a теста суме рангова износи 50. Како је израчуната статистика теста $W_a = 57,0$ већа од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ може се закључити, да је значајно боља нервна проводљивост измерена у узорку пре секције нерва од узорка након реконструкције.

Груписање најбољих рангова извршено је у узорку n1-пре секције нерва. Дескриптивна статистика поткрепљује закључака, односно велика разлика у медијанама у корист n1: $Me_1(38,72) > Me_2(24,13)$ (Табела 4.29).

На основу статистичких параметара закључено је, да је брзина нервне проводљивости код групе I знатно мања након реконструкције (n 2) у односу на вредности пре секције нерва (n 1), што сугерише на неадекватност ове методе у процесу неурорегенерације.

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе II пре индуковане повре нерва (n1) и након реконструкције (n2) (Табела 4.30).

Табела 4.30. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе II подгрупе „А“

Редни број	Здружене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
Узорак	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
1	41,97		12,00		12	41,97	12
2	39,87		11,00		11	39,87	11
3	39,21		10,00		10	39,21	10
4	38,00		9,00		9	38,00	9
5	37,25		8,00		8	37,25	8
6	36,76		7,00		7	36,76	7
7		26,21		6,0	6	26,21	6
8		25,48		5,0	5	25,48	5
9		25,04		4,0	4	25,04	4
10		24,50		3,0	3	24,50	3
11		22,70		2,0	2	22,70	2
12		22,61		1,0	1	22,61	1
Суме рангова узорака:			57,0	21,0			
Медијане	38,61	24,77	Wa	Wb			
AS	38,84	24,42					

- n1-контролна страна
- n2- експериментална страна

Како је и код ове методе као и код претходне израчуната статистика теста $W_a = 57,0$ већа од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ може се закључити, да је у процесу опоравка нерва применом методе код групе II, значајно боља нервна проводљивости нађена у узорку пре хируршке интервенције у односу на узорак након хируршке интервенције.

Дескриптивна статистика, односно разлика у медијанама и у овом случају је велика значајно је мања у узорку након хируршке интервенције: $Me_1(38,61) > Me_2(24,77)$ (Табела 4.30).

На основу изнетих резултата примећено је, да је метод реконструкције повређеног фацијалног нерва примењен у оквиру I и II групе подгрупе „А“ несврсисходан и неефикасан у процесу нервне регенерације.

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе III пре индуковане повре нерва (n1) и након реконструкције (n2) приказано је у Табели 4.31.

Табела 4.31. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе III подгрупе „А“

Редни број	Здružене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
Узорак							
1	42,04		12,00		12	42,04	12
2	41,11		11,00		11	41,11	11
3	40,79		10,00		10	40,79	10
4	39,60		8,00		9	39,68	9
5	39,00		7,00		8	39,60	8
6	37,98		4,00		7	39,00	7
7		39,68		9,0	6	38,86	6
8		38,86		6,0	5	38,52	5
9		38,52		5,0	4	37,98	4
10		37,86		3,0	3	37,86	3
11		37,66		2,0	2	37,66	2
12		37,56		1,0	1	37,56	1
Суме рангова узорака:			52,0	26,0			
Медијане	40,20	38,19	Wa	Wb			
AS	40,09	38,36					

Полазећи од претпоставке дате са H_0 испитан је горњи праг значајности са циљем да се потврде очекивања дата са H_1 .

За узорке величине $n_1 = 6$ и $n_2 = 6$ горња критична вредност W_a теста суме рангова износи 50. Како је израчуната статистика теста $W_a = 52,0$ већа од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ може се закључити, да је у процесу опоравка нерва применом методе код групе III боља нервна проводљивости нађена у узорку пре секције нерва у односу на узорак након реконструкције. Разлика у медијанама у овом случају није толико велика, али су нешто бољи рангови груписани у узорку n_1 пре хируршке интервенције: $Me_1(40,20) > Me_2(38,19)$ (Табела 4.31).

На основу наведеног запажено је, да метода примењена код групе III може имати високи неурорегенеративни потенцијал.

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе IV пре индуковане повреде нерва (n1) и након реконструкције (n2) приказано је у Табели 4.32.

Табела 4.32. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе IV подгрупе „А“

Редни број	Здружене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
Узорак	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
1	41,79		12,00		12	41,79	12
2	41,28		11,00		11	41,28	11
3	39,86		10,00		10	39,86	10
4	39,36		7,00		9	39,79	9
5	39,29		6,00		8	39,68	8
6	37,58		2,00		7	39,36	7
7		39,79		9,0	6	39,29	6
8		39,68		8,0	5	39,09	5
9		39,09		5,0	4	38,67	4
10		38,67		4,0	3	38,15	3
11		38,15		3,0	2	37,58	2
12		37,17		1,0	1	37,17	1
Суме рангова узорака:			39,0	30,0			
Медијане	39,61	38,88	Wa	Wb			
AS	39,86	38,76					

Како је израчуната статистика теста $W_a=39,0$ мања од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ не може се одбацити H_0 о једнакости ефеката па се може закључити, да у процесу опоравка нерва применом методе код групе IV боља нервна проводљивости није нађена нити у једном од узорака.

Разлика у медијанама у овом случају је мала: $Me_1(39,61) > Me_2(38,88)$ (Табела 4.32). Из наведеног произилази, да је метода примењена у оквиру IV групе најоптималнија са дискретном предношћу у односу на методу примењену код групе III.

4.2.2.5.. Поређење брзине нервне проводљивости међу групама подгрупе „Б“

У трећој фази експеримента одређена је брзина нервне проводљивости по претходно утврђеном протоколу за све групе подгрупе „Б“ пре индуковане секције нерва и након реконструкције, а резултати су упоређени међу групама (Табеле 4.33; 4.34; 4.35; 4.36).

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе I пре индуковане повреде нерва (n1) и након реконструкције нерва (n2) приказано је у Табели 4.33.

Табела 4.33. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне стране (n2) код групе I подгрупе „Б“

Редни број	Здružене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
Узорак							
1	40,46		12,00		12	40,46	12
2	40,00		11,00		11	40,00	11
3	39,54		10,00		10	39,54	10
4	38,46		9,00		9	38,46	9
5	38,08		8,00		8	38,08	8
6	37,19		7,00		7	37,19	7
7		30,00		6,0	6	30,00	6
8		29,71		5,0	5	29,71	5
9		28,38		4,0	4	28,38	4
10		27,90		3,0	3	27,90	3
11		26,61		2,0	2	26,61	2
12		26,59		1,0	1	26,59	1
Суме рангова узорака:			57,0	21,0			
Медијане	39,00	28,14	Wa	Wb			
AS	38,96	28,20					

Полазећи од претпоставке дате са H_0 испитан је горњи праг значајности у циљу позитивног исхода датог са H_1 . За узорке величине $n_1 = 6$ и $n_2 = 6$ горња критична вредност W_a теста суме рангова износи 50. Како је израчуната статистика теста $W_a = 57,0$ већа од горње критичне вредности то се при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ може приметити, да је у процесу опоравка нерва применом методе код групе I значајно боља нервна проводљивост у овој подгрупи у узорку пре секције нерва од узорка након реконструкције, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n_1 , али и дескриптивна статистика, односно велика разлика у медијанама: $Me_1(39,00) > Me_2(28,14)$ (Табела 4.33).

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе II пре секције нерва (n_1) и након реконструкције нерва (n_2) приказано је у Табели 4.34.

Табела 4.34. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе II подгрупе „Б“

Редни број	Здружене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
Узорак	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
1	41,21		12,00		12	41,21	12
2	40,00		11,00		11	40,00	11
3	39,80		10,00		10	39,80	10
4	39,31		9,00		9	39,31	9
5	38,91		8,00		8	38,91	8
6	37,86		7,00		7	37,86	7
7		28,68		6,0	6	28,68	6
8		26,82		5,0	5	26,82	5
9		26,65		4,0	4	26,65	4
10		25,73		3,0	3	25,73	3
11		25,55		2,0	2	25,55	2
12		25,42		1,0	1	25,42	1
Суме рангова узорака:			57,0	21,0			
Медијане	39,56	26,19	Wa	Wb			
AS	39,52	26,48					

Полазећи од претпоставке дате са H_0 спроведено је испитивање горњег прага значајности са циљем потврде очекивања датог са H_1 . За узорке величине $n_1 = 6$ и $n_2 = 6$ горња критична вредност W_a теста суме рангова износи 50.

Израчуната статистика теста $W_a = 57,0$ већа је од горње критичне вредности па је при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha = 0,05$ примећено, да је у процесу опоравка нерва применом методе код групе II значајно боља нервна проводљивост нађена у узорку пре секције нерва у односу на узорак након спроведене методе реконструкције у наведеној групи. Дескриптивна статистика, односно разлика у медијанама и у овом случају је велика, значајно је мања у узорку након реконструкције нерва: $Me_1(39,56) > Me_2(26,19)$ (Табела 4.34).

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе III пре секције нерва (n_1) и након реконструкције нерва (n_2) приказано је табеларно (Табела 4.35).

Табела 4.35. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе III подгрупе „Б“

Редни број	Здružене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
Узорак							
1	41,00		12,00		12	41,00	12
2	40,19		11,00		11	40,19	11
3	39,44		8,00		10	40,12	10
4	39,11		5,00		9	39,50	9
5	38,54		3,00		8	39,44	8
6	37,64		1,00		7	39,19	7
7		40,12		10,0	6	39,16	6
8		39,50		9,0	5	39,11	5
9		39,19		7,0	4	39,03	4
10		39,16		6,0	3	38,54	3
11		39,03		4,0	2	38,19	2
12		38,19		2,0	1	37,64	1
Суме рангова узорака:			40,0	38,0			
Медијане	39,18	39,28	Wa	Wb			
AS	39,20	39,32					

Полазећи од претпоставке дате са H_0 испитиван је горњи праг значајности у циљу потврде очекивања дата са H_1 . За узорке величине $n_1 = 6$ и $n_2 = 6$ горња критична вредност W_a теста суме рангова износи 50.

Како је израчуната статистика теста $W_a = 40,0$ мања од горњег прага значајности 50 (интервал прихватања $H=0$ је између граница 28,50) при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha = 0,05$ запажено је, да у процесу опоравка нерва применом методе у групи III не постоји статистички значајна разлика у брзини нервне проводљивости између узорака пре секције и након хируршке реконструкције.

Разлика у медијанама у овом случају је врло мала, што упућује на непостојање статистички значајне разлике: $Me_2(39,28) > Me_1(39,18)$ (Табела 4.35).

Међусобно поређење вредности брзине нервне проводљивости код групе IV пре секције (n_1) и након реконструкције (n_2) нерва приказано је у Табели 4.36.

Табела 4.36. Поређење вредности брзине нервне проводљивости контролне (n1) и експерименталне (n2) стране код групе IV подгрупе „Б“

Редни број	Здрузене опсервације узорака		Рангиране опсервације узорака		Обрачун рангова		
Узорак	n1	n2	Ранг n1	Ранг n2	P/b	Подаци	Ранг
1	40,64		12,00		12	40,64	12
2	40,33		11,00		11	40,38	11
3	39,87		7,50		10	40,33	10
4	39,75		6,00		9	40,25	9
5	39,42		3,50		8	39,87	7,5
6	37,98		1,00		7	39,87	7,5
7		40,38		11,0	6	39,75	6
8		40,25		9,0	5	39,54	5
9		39,87		7,5	4	39,42	3,5
10		39,54		5,0	3	39,42	3,5
11		39,42		3,5	2	39,22	2
12		39,22		2,0	1	37,98	1
Суме рангова узорака:			41,0	38,0			
Медијане	39,71	39,81	Wa	Wb			
AS	39,78	39,67					

Полазећи од претпоставке дате са H_0 испитиван је горњи праг значајности желећи да се потврде очекивања дата са H_1 . За узорке величине $n_1 = 6$ и $n_2 = 6$ горња критична вредност W_a теста суме рангова износи 50.

Како је израчуната статистика теста $W_a = 41,0$ мања од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha = 0,05$ не може се одбацити H_0 о једнакости ефеката примећује се, да у процесу опоравка нерва применом методе IV боља нервна проводљивости није нађена ни у једном од узорака. То потврђују суме рангова које су блиске.

Дескриптивна статистика, односно разлика у медијанама у овом случају је врло мала: $Me_2(39,81) > Me_1(39,71)$ и потврђује статистику теста (Табела 4.36).

Како су се у овом експерименту испитивале два временски зависна параметра посматрања направљено је поређење између истих на основу добијених резултата. Није нађена статистичка разлика када је реч о временској зависности регенерације повређеног нерва.

Нако шесте недеље средње вредности брзине нервне проводљивости код III групе износиле су $Me = 38,19$ (Табела 4.31), дакле статистички су незнатно били слабији у односу на период након осам недеља $Me = 39,28$ (Табела 4.35). Код IV групе имамо сличну ситуацију након шест недеља средња вредност брзине нервне проводљивости је износила $Me = 38,88$ (Табела 4.32) по истеку осме недеље та вредност је била $Me = 39,81$ (Табела 4.36).

Обе методе (групе III и IV) показују висок степен опоравка нерва шест недеља након повреде тако да даља временска ограничења нису неопходна у сврху додатног испитивања процеса регенерације.

4.2.2. ОДРЕЂИВАЊЕ АМПЛИТУДЕ МИШИЋНОГ ОДГОВОРА

Вредности амплитуде мишићног одговора одређене су у првој фази експеримента, пре хируршки индуковане секције нерва код свих група обе подгрупе („А“ и „Б“) за експерименталну и контролну страну. Добијене вредности упоређиване су међу групама.

У трећој фази експеримента спроведена су мерења амплитуде само за експерименталну страну код обе подгрупе у временској зависности посматрања (шест и осам недеља). Упоредене су вредности амплитуде експерименталне (леве) стране пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва међу групама.

Коначне вредности амплитуде одређене су на основу прихваћене формуле дељењем средњих вредности повређене (експерименталне) стране добијених након реконструкције нерва (непосредно пре жртвовања животиња) са вредностима амплитуде здраве (контролне) стране пре индуковане секције нерва, код свих група обе подгрупе.

Количник наведених параметара се помножи са сто и изрази у процентима, добијени резултати се упореде по групама. За процену успешног опоравка фацијалног нерва вредности амплитуде повређене (експерименталне) стране треба да износе између 70 и 95 процената вредности амплитуде здраве (контролне) стране (65).

Треба напоменути, да се овај параметар посматрања базирао само на експерименталну страну где су се добијени скорови упоређивали пре хируршки индуковане секције нерва, што можемо тумачити као здрав нерв и након спроведене репарације нерва неком од наведених метода реконструкције, што одговара повређеном нерву.

Овај протокол испитивања се базира на претходно утврђеним резултатима осталих електрофизиолошких испитивања, вредности експерименталне (лева) и контролне (десна) стране пре хируршки индуковане повреде нерва биле су идентичне, дакле у наставку експеримента као контролна страна коришћена је експериментална (лева) страна пре индуковане повреде нерва. Вредности амплитуде су приказане у микроволтима (μV).

4.2.2.1. Одређивање амплитуде пре и након реконструкције нерва подгрупе „А“

Пре хируршки индуковане секције нерва и након реконструкције у задатом временском интервалу након шест недеља (подгрупа „А“) по утврђеној методи одређена је амплитуда за све групе експерименталне стране.

Добијени резултати су приказани табеларно (Табеле 4.37; 4.38).

Табела 4.37. Вредности амплитуде пре секције нерва подгрупа „А“

Кунић	МЕТОД (по групама) -РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	1,98	2,50	2,00	4,00	1,95	1,00	1,98	2,50
2	2,06	6,50	2,03	5,00	2,06	6,50	2,22	9,00
3	2,14	8,00	2,25	10,50	2,37	15,50	2,25	10,50
4	2,34	13,50	2,37	15,50	2,41	17,00	2,26	12,00
5	2,34	13,50	2,46	19,00	2,56	21,00	2,48	20,00
6	2,45	18,00	2,61	23,00	2,65	24,00	2,57	22,00
Ti	13,31	62,00	13,72	77,00	14,00	85,00	13,76	76
H =	0,913							
Me	2,24		2,31		2,39		2,26	

H0: Узорци припадају истом основном скупу, тј. имају једнаке медијане, тј. нема разлике у амплитуди у зависности од примењене методе

H1: Бар два узорка се по параметру локације, медијани, разликују од осталих

Како је израчуната вредност *Kruskal-Wallisove* статистике $H=0,913$ мања од табличне вредности $H_t=7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободe и при задатом ризику $\alpha=0,05$) може се одбацити H_0 о једнакости медијана, тј. ефеката у свим групама.

У овом делу експеримента не постоји статистички значајна разлика у амплитуди која се може приписати некој од група у подгрупи „А“ пре хируршки индуковане секције нерва (Табела 4.37).

Обзиром на резултат овог теста, када је израчуната статистика мања од граничне вредности није потребно *Mann-Whitney-Wilcoxon-ov* тестом, тражити разлике између парова посматраних група. У прилог овог закључка иде блискост средњих вредности – медијана (Me).

Табела 4.38. Вредности амплитуде након реконструкције нерва погрупа „А“

Кунић	МЕТОД (по групама) - РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	1,05	3,00	1,07	7,50	1,90	13,00	2,02	16,00
2	1,06	5,00	1,11	18,00	1,98	11,00	1,92	14,00
3	1,09	9,00	1,09	9,00	2,05	17,00	2,11	18,00
4	1,04	1,50	1,16	12,00	2,37	22,00	2,31	21,00
5	1,06	5,00	1,04	1,50	2,41	23,00	2,43	24,00
6	1,06	5,00	1,07	7,50	2,21	20,00	2,16	19,00
Ti	6,36	28,50	6,54	55,50	12,92	106,00	12,95	112,00
H =	17,242							
Me	1,06		1,08		2,13		2,14	

Израчуната вредност *Kruskal-Wallisove* статистике $H=17,242$ је већа од табличне граничне вредности $H_t=7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободe и при задатом ризику $\alpha=0,05$), што иде у прилог H_1 да се бар два узорка у ефектима (амплитуди) статистички значајно разликују од осталих у подгрупи "А" након реконструкције нерва за експерименталну страну (Табела 4.38).

Симултаним поређењем ефеката одређено је између којих група та разлика постоји, а вредности су приказане табеларно (Табела 4.39).

Табела 4.39. Симултано поређење група након реконструкције нерва у подгрупи "А "

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Амплитуда Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28,50)					
	I – II	I – III	I – IV	II – III	II – IV	III – IV
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=18,373	Wb = 49 Wa = 29	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wa = 38 Wb = 40
$H_v=3, \alpha<7,815$	28<Wb<50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	28<Wb<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења метода група I и II израчуната статистика теста Wb = 49 иако близу горње границе није већа од горњег прага значајности, што искључује постојање статистички значајне разлике. У поређењу методе групе I са методама група III и IV статистика теста Wb =57 већа је од горњег критичног прага те уз наведени ризик може се закључити, да се методама група III и IV постижу значајно бољи резултати него методом групе I ($p<0,05$). Исто тако, на основу статистике теста Wb =57 методама група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом групе II ($p<0,05$). При поређењу метода група III и IV статистика теста Wb = 40 указује на извесну малу предност групе IV у односу на групу III (W=38). Ипак, то није довољно за одбацивање H0 те је запажено да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између метода примењених код ових група ($p>0,05$) (Табела 4.39).

На основу приказаних резултата показано је да су методе примењене код група III и IV далеко супериорније од метода примењених код I и II групе.

Да би приказали однос вредности амплитуде међу групама пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва одређене су разлике вредности амплитуде за сваку групу посебно.

Из претходно урађених анализа произилази, да се вредности амплитуде знатно смањују након повреде нерва и у даљем току пратећи процес регенерације враћају у оквир референтних вредности пре повреде, што би значило да веће вредности амплитуде сугеришу на већи степен неурорегенерације. На том темељу је и постављена претпоставка дата са нултом хипотезом, да нема разлике у ефектима између група пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва испитиван је горњи праг значајности у жељи, да се потврде очекивања дата са H1, да је амплитуда значајно боља у узорку пре повреде (секције) од оне у узорку након реконструкције.

За узорке величине n1=6 и n2=6 горња критична вредност Wa теста суме рангова износи 50 распон 28,50.

4.2.2.2. Поређење вредности амплитуде пре секције и након реконструкције нерва по групама - подгрупе „А“

У даљем процесу анализирања добијених вредности амплитуде код подгрупе „А“ упоређене су вредности пре хируршки индуковане секције нерва (контролна страна n1) и након реконструкције (експериментална страна n2) по групама (Табеле 4.40; 4.41, 4.4; 4.43).

Табела 4.40. Поређење вредности амплитуде групе I пре и након реконструкције

Група	1	2	3	4	5	6	Me
I – пре (n1)	2,45	2,34	1,98	2,06	2,14	2,34	2,24
I – након (n2)	1,05	1,06	1,09	1,04	1,06	1,06	1,06

Како је израчуната статистика теста $W_a = 57,0$ већа од горње критичне вредности, то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ запажено је да је амплитуда применом методе код групе I значајно боља у узорку пре индуковане секције од узорка након реконструкције нерва, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n1. Дескриптивна статистика, односно велика разлика у медијанама: $Me_1 = 2,24$; $Me_2 = 1,06$ потврђује претходно изнету тврдњу (Табела 4.40). На основу приказаних резултата утврђено је, да метода примењена у групи I не даје задовољавајуће ефекте у процесу нервне регенерације.

Табела 4.41. Поређење вредности амплитуде групе II пре и након реконструкције

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
II – пре (n1)	2,46	2,61	2,37	2,03	2,00	2,25	2,31
II – након (n2)	1,07	1,11	1,09	1,16	1,04	1,07	1,08

Вредности амплитуде, применом методе групе II значајно су боље у узорку пре секције од узорка након реконструкције нерва, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n1, али и дескриптивна статистика, тј. велика разлика у медијанама: $Me_1 = 2,31$; $Me_2 = 1,08$ (Табела 4.41). И ова метода примењена у групи II не даје задовољавајуће резултате.

Табела 4.42. Поређење вредности амплитуде групе III пре и након реконструкције

Група / n	1	2	3	4	5	6	Me
III – пре (n1)	1,95	2,06	2,37	2,65	2,56	2,41	2,39
III - након (n2)	1,90	1,98	2,05	2,37	2,41	2,21	2,13

Како је израчуната статистика теста $W_a = 47,0$ мања од горње критичне вредности, то при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha = 0,05$ може се утврдити, да применом методе групе III не постоји статистички значајна разлика између узорака пре индуковане секције и након реконструкције нерва. Груписање виших рангова јесте извршено у узорку n1, али недовољно да би се испољила статистичка значајност.

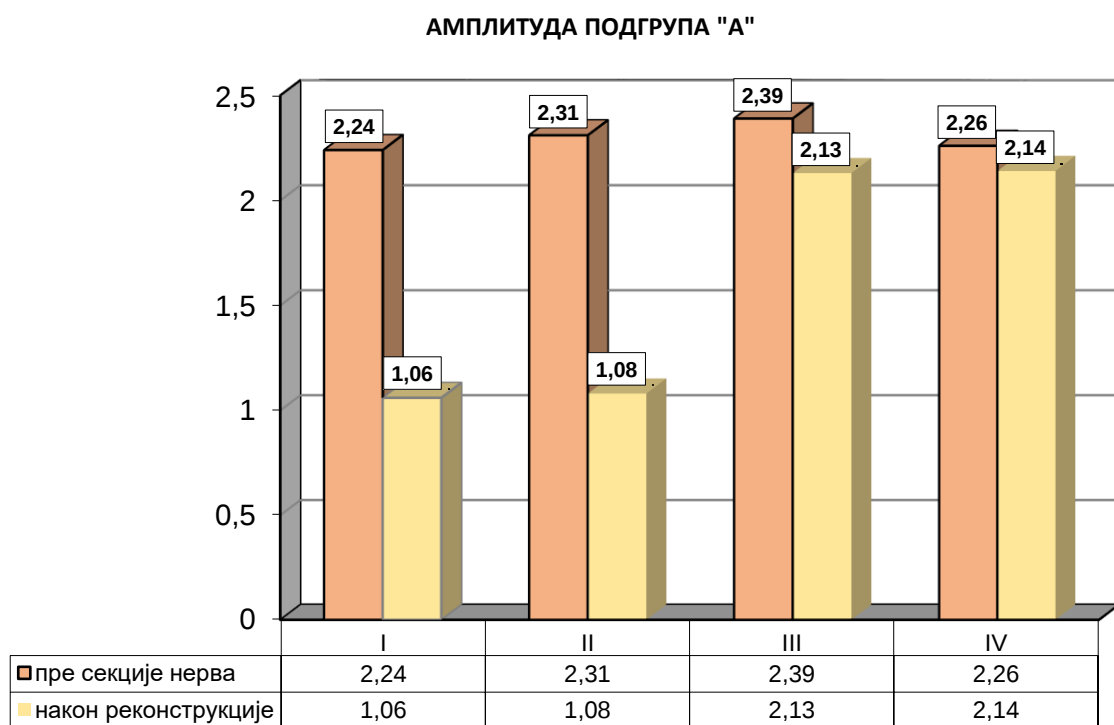
Дескриптивна статистика иде томе у прилог, тј разлика у медијанама није велика: $Me_1 = 2,39$; $Me_2 = 2,13$ (Табела 4.42). Овом методом се амплитуде узорака приближавају оним пре повреде нерва, што указује на успешност ове методе реконструкције.

Табела 4.43. Поређење вредности амплитуде групе IV пре и након реконструкције

Група/n	1	2	3	4	5	6	Me
IV - пре (n1)	2,25	1,98	2,22	2,48	2,57	2,26	2,26
IV – након (n2)	2,02	1,92	2,11	2,31	2,43	2,16	2,14

Израчуната статистика теста $W_a = 46,0$ мања је од горње критичне вредности дакле при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha = 0,05$ може се закључити, да применом методе код групе IV не постоји статистички значајна разлика између узорака пре секције и након реконструкције нерва. Груписање виших рангова је нешто израженије у узорку n1, али недовољно да би се испољила статистичка значајност. Дескриптивна статистика иде томе у прилог, тј разлика у медијанама није велика: $Me_1 = 2,26$; $Me_2 = 2,14$ (Табела 4.43). Овом методом се амплитуда узорака још више приближавају оним пре секције нерва него што је то био случај са методом групе III, али без статистичке значајности.

Добијени скорови амплитуде за све групе подгрупе „А“ пре хируршки инуковане секције и након реконструкције нерва сумирани су и приказани графички (Графикон 4.8).

Графикон 4.8 : Амплитуда - пођење ефеката (средњих вредности) пре индуковане секције и након реконструкције нерва подгрупе „А“ (μV)

Како је познато да се најмање вредности амплитуде очекују након повреде нерва, а да раст амплитуде осликава и степен регенерације повређених аксона, те посматрајући сумиране скорове амплитуде пре секције и након реконструкције нерва, да се уочити приближавање

вредности амплитуде група III и IV шест недеља након реконструкције повређеног фацијалног нерва референтним вредностима одређеним пре повреде нерва (Графикон 4.8).

Овај податак потврђује оправданост хипотеза, да раст амплитуде мишићног одговора прати степен неурорегенерације.

4.2.2.3. Одређивање амплитуде пре и након реконструкције нерва подгрупе „Б“

На основу статистичких тестова одрђене су вредности амплитуде група подгрупе „Б“ пре секције (контролна страна) и након реконструкције (експерименталне страна) нерва (Табеле 4.44, 4.45).

Табела 4.44. Вредности амплитуде пре секције нерва подгрупа „Б“

Кунић	МЕТОД (по групама) - РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	1,90	2,00	1,89	1,00	1,97	3,00	2,08	5,00
2	2,16	6,00	2,03	4,00	2,19	7,00	2,26	9,00
3	2,25	8,00	2,52	14,00	2,53	16,00	2,28	10,50
4	2,28	10,50	2,57	18,50	2,54	17,00	2,39	12,00
5	2,49	13,00	2,64	20,00	2,68	22,00	2,52	15,00
6	2,76	23,50	2,65	21,00	2,76	23,50	2,57	18,50
Ti	13,84	63,00	14,30	78,50	14,67	88,50	14,10	70,00
H =	1,212							
Me	2,27		2,55		2,54		2,34	

Табела.4.45. Вредности амплитуде након реконструкције нерва подгрупа „Б“

Кунић	МЕТОД (по групама) – РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	1,07	2,00	1,09	3,50	2,57	24,00	1,99	14,00
2	1,04	1,00	1,16	8,50	1,94	13,00	2,17	17,00
3	1,11	5,00	1,20	11,00	2,37	21,00	2,26	19,00
4	1,15	7,00	1,21	12,00	2,41	22,00	2,25	18,00
5	1,09	3,50	1,16	8,50	2,14	16,00	2,10	15,00
6	1,17	10,00	1,12	6,00	2,49	23,00	2,27	20,00
Ti	6,63	28,50	6,94	49,50	13,92	119,00	13,04	103,00
H=	18,442							
Me	1,10		1,16		2,39		2,21	

На основу вредности добијених истом методом *Kruskal-Wallisove* статистике амплитуда између група I, II, III и IV не показује значајне разлике у подгрупи „Б“ (експериментална страна).

Обзиром на статистику овог теста није потребно вршити симултано поређење између група. У прилог овог закључка иде блискост средњих вредности – медијана (Табела 4.44).

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis*ове статистике $H=18,442$ већа је од табличне граничне вредности $H_t=7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободе и при задатом ризику $\alpha = 0,05$), што иде у прилог H_1 да се бар два узорка у ефектима (амплитуди) статистички значајно разликују од осталих у подгрупи "Б", након реконструкције нерва за експерименталну страну (Табела 4.45).

Симултаним поређењем ефеката међу групама одређено је између којих група та разлика постоји (Табела 4.46.).

Табела 4.46. Симултано поређење група након реконструкције нерва у подгрупи "Б "

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Амплитуда Wilcoxon W_a ; significant level ($\alpha=0,05$); $n_1=n_2=6$, significant interval (28,50)					
	I – II	I – III	I – IV	II – III	II – IV	III – IV
	$H_0: M_2=M_1$ $H_1: M_2>M_1$	$H_0: M_3=M_1$ $H_1: M_3>M_1$	$H_0: M_4=M_1$ $H_1: M_4>M_1$	$H_0: M_3=M_2$ $H_1: M_3>M_2$	$H_0: M_4=M_2$ $H_1: M_4>M_2$	$H_0: M_4=M_3$ $H_1: M_4>M_3$
$H=18,373$	$W_b = 49,5$ $W_a = 28,5$	$W_b = 57$	$W_b = 57$	$W_b = 57$	$W_b = 57$	$W_a = 46$ $W_b = 31$
$H_{v=3,\alpha}<7,815$	$28<W_b<50$	$W_b > 50$	$W_b > 50$	$W_b > 50$	$W_b > 50$	$28<W_b<50$
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења примењених метода код група I и II израчуната статистика теста $W_b=49,5$ иако врло близу горње границе и са више измерених бољих ефеката ипак није већа од горњег прага значајности, што искључује постојање статистички значајне разлике.

У поређењу методе код групе I са методама група III и IV статистика теста $W_b=57$ прелази горњи критични праг те уз наведени ризик може се приметити, да се методама код група III и IV постижу значајно бољи резултати него методом примењеном код групе I односно, да постоји знатна статистичка разлика између група III и IV у односу на групу I ($p<0.05$). Исто тако, на основу статистике теста $W_b=57$ методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом код групе II ($p<0.05$).

При поређењу метода група III и IV статистика теста $W_b=31$ указује на извесну инфериорност групе III у односу на групу IV где је сума рангова досегла $W_a=46$. Ипак, то није било довољно за одбацивање нулте хипотезе те се може закључити, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између ове две групе ($p>0.05$) (Табела 4.46).

Даље испитивање се базирало на симултаним поређењем истих група подгрупе „Б“ пре и након реконструкције повређеног нерва.

4.2.2.4. Поређење вредности амплитуде пре и након реконструкције нерва по групама подгрупе „Б“

Добијени резултати амплитуде пре индуковане секције и након реконструкције нерва подгрупе „Б“ упоређени су између сваке групе посебно (Табеле 4.4, 4.48, 4.49, 4.50).

Табела 4.47. Поређење вредности амплитуде групе I пре и након реконструкције

Група/п	1	2	3	4	5	6	Ме
I – пре (n1)	2,16	1,90	2,49	2,76	2,28	2,25	2,27
I – након (n2)	1,07	1,04	1,11	1,15	1,09	1,17	1,10

Како је израчуната статистика теста $W_a=57,0$ већа од горње критичне вредности то при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha=0,05$ може се закључити, да је амплитуда применом методе групе I значајно боља у узорку пре секције од узорка након реконструкције нерва, што поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n1, али и дескриптивна статистика, тј. велика разлика у медијанама: $Me_1 = 2,27$; $Me_2 = 1,10$ (Табела 4.47).

Табела 4.48. Поређење вредности амплитуде групе II пре и након реконструкције

Група/ п	1	2	3	4	5	6	Ме
II – прт (n1)	2,65	1,89	2,64	2,52	2,03	2,57	2,55
II – након (n2)	1,09	1,16	1,20	1,21	1,16	1,12	1,16

Израчуната статистика теста $W_a=57,0$ већа је од горње критичне вредности па се при нивоу значајности 95% или ризику $\alpha=0,05$ може запазити, да је амплитуда применом методе групе II значајно боља у узорку пре секције од узорка након реконструкције нерва, што такође поткрепљује груписање најбољих рангова у узорку n1, али и дескриптивна статистика, односно велика разлика у медијанама: $Me_1 = 2,55$; $Me_2 = 1,16$ (Табела 4.48.)

Табела 4.49. Поређење вредности амплитуде групе III пре и након реконструкције

Група /п	1	2	3	4	5	6	Ме
III – пре (n1)	2,76	1,97	2,54	2,68	2,19	2,53	2,54
III – након (n2)	2,57	1,94	2,37	2,41	2,14	2,49	2,13

Како је израчуната статистика теста $W_a=46,0$ мања од горње критичне вредности те при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha=0,05$ може се приметити, да применом методе групе III не постоји статистички значајна разлика између узорака пре хируршки индуковане секције и након реконструкције нерва.

Груписање виших рангова јесте извршено у узорку n1, али недовољно да би се испољила статистичка значајност. Дескриптивна статистика иде томе у прилог, односно разлика у медијанама није велика: $Me_1 = 2,54$; $Me_2 = 2,13$ (Табела 4.49).

Овом методом се амплитуда узорака n2-након реконструкције нерва, приближава оним вредностима пре индуковане секције (повреде).

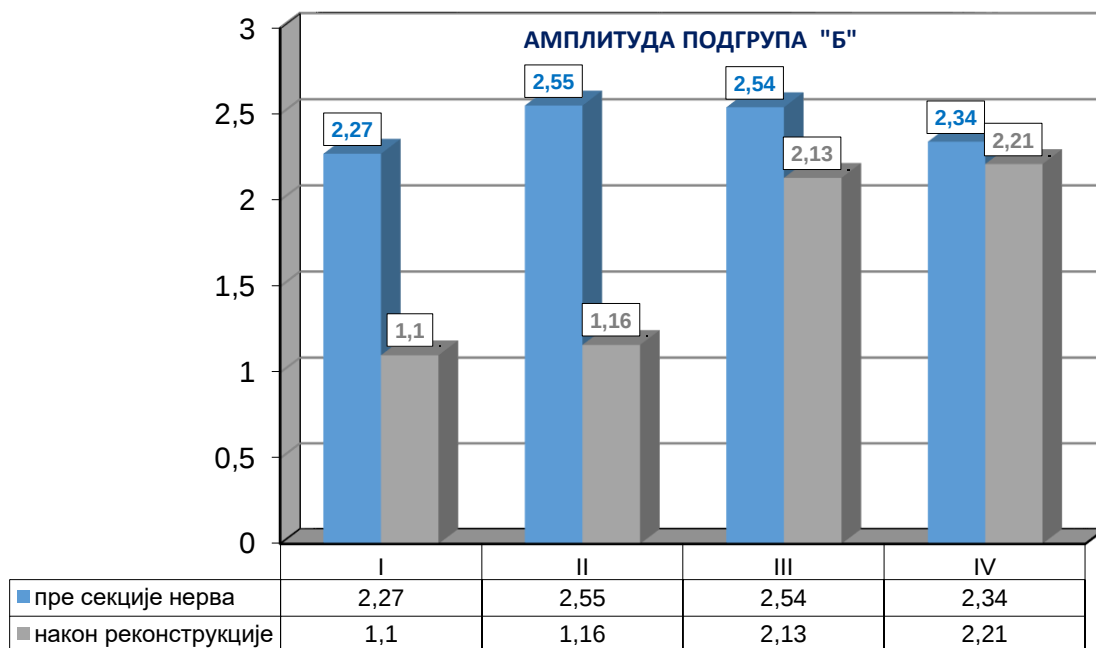
Табела 4.50. Поређење вредности амплитуде групе IV пре и након реконструкције

Група/n	1	2	3	4	5	6	Me
IV- пре (n1)	2,08	2,57	2,39	2,52	2,26	2,28	2,34
IV – након (n2)	1,99	2,17	2,26	2,25	2,10	2,27	2,21

Израчуната статистика теста $W_a=50,5$ већа од горње критичне вредности и при нивоу значајности 95%, или ризику $\alpha=0,05$ указује, да применом методе групе IV, иако на самој горњој граници, ипак постоји невелика, али статистички значајна разлика између узорака пре секције и након реконструкције нерва у подгрупи „Б“. Разлика у медијанама износи: $Me_1 = 2,34$; $Me_2 = 2,21$ (Табела 4.50). Овом методом се амплитуда узорака још више приближавају оним пре секције нерва него што је то био случај са методом групе III готово да нема разлике у ефектима, односно нема статистичке значајности разлика посматрања наведеног параметра ($p>0.05$).

Вредности амплитуде код група III и IV се приближавају вредностима амплитуде пре секције нерва у периоду од осам недеља након спроведене реконструкције (Графикон 4.9). Да се закључити, да су методе примењене код група III и IV где се као материјал за репарацију повређеног нерва употребила плазма богата тромбоцитима показале висок степен опоравка нерва пратећи параметре посматрања приказане вредностима амплитуде.

Израчуната средња вредност сумираних скорова амплитуде за све групе подгрупе „Б“ пре индуковане секције и након реконструкције приказани су графички (Графикон 4.9).



Графикон 4.9. Амплитуда - поређење ефеката (средњих вредности) пре секције и након реконструкције нерва подгрупа „Б“ (μV)

Сумиране вредности амплитуде код подгрупе „Б“ указују на раст амплитуде код група III и IV које се приближавају вредностима пре спроведене секције нерва, што указује на брзину регенерације аксона.

Ако се посматра временска дистанца приметиће се, да не постоји статистичка разлика између подгрупа „А“ и „Б“ (Графикони 4.8, 4.9), стога се запажа, да је довољан период за процес регенерације повређеног фацијалног нерва у оквиру шест недеља од тренутка репарације применом плазме обogaћене тромбоцитима.

Да би се утврдила ефикасност примењених метода употребљена је формулу за израчунавање процента успешности опоравка фацијалног нерва након повреде, која представља количник вредности амплитуде експерименталне (повређене) стране са вредностима амплитуде контролне (здраве) стране. Добијене вредности су помножене са сто и изражене у процентима. На овај начин је одређена амплитуда за све групе обе подгрупе.

Како је у претходном делу рада назначено, да су вредности електрофизиолошких испитивања пре индуковане секције нерва идентични за експерименталну и контролну страну, стога је у наставку овог експеримента као контролна страна употребљена експериментална (здрава) страна пре секције нерва.

4.2.2.5. Процентуално одређивање вредности амплитуде подгрупа „А“ и „Б“

Како би се приказала успешност примењених метода у процесу неурорегенерације израчунат је количник амплитуде експерименталне стране након реконструкције (повређена страна) и амплитуде експерименталне стране (здрава страна) пре хируршки индуковане секције нерва, добијени резултати су приказани процентуално.

Количник вредности амплитуде експерименталне стране пре индуковане секције и након реконструкције нерва у подгрупи „А“ приказан је табеларно (Табела 4.51).

Табела 4.51. Количник вредности амплитуде по групама подгрупе „А“

Кунић	МЕТОД (по групама) – РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	42	1,50	43,00	3,00	97,00	24,00	89,00	14,50
2	45	5,00	42,00	1,50	96,00	22,50	96,00	22,50
3	55	11,00	45,00	5,00	86,00	13,00	95,00	20,50
4	50	9,00	57,00	12,00	89,00	14,50	93,00	17,00
5	49	7,50	52,00	10,00	94,00	18,50	94,00	18,50
6	45	5,00	49,00	7,50	91,00	16,00	95,00	20,50
Ti	286,00	39,00	288,00	39,00	553,00	108,50	562,00	113,5
H =	17,322							
Me	47,00		47,00		92,50		94,50	

Како је израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=17,322$ већа од табличне вредности $H_{\alpha}=7,815$ (из таблице χ^2 тест распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободe и при задатом ризику $\alpha=0.05$) може се одбацити H_0 о једнакости медијана, односно ефеката у свим примењеним методама.

У овом експерименту постоји статистички значајна разлика у количницима амплитуде која се може приписати некој од група у подгрупи "А"(Табела 4.51.). Стога су извршена симултана поређења свих група у подгрупи „А“ (Табела 4.52).

Табела 4.52. Амплитуда - количник леве експерименталне (након реконструкције) и леве контролне (пре секције) стране по групама подгрупе „А“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Амплитуда - количник леве постоперативне и леве преоперативне групе у подгрупи "А"					
	Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28,50)					
	I – II H0: M2=M1 H1: M2>M1	I – III H0: M3=M1 H1: M3>M1	I – IV H0: M4=M1 H1: M4>M1	II – III H0: M3=M2 H1: M3>M2	II – IV H0: M4=M2 H1: M4>M2	III – IV H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=17,322	Wb = 39 Wa = 39	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wb = 57	Wa = 36,5 Wb = 41,5
$H_v=3, \alpha<7,815$	28<Wb<50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	Wb > 50	28<Wb<50
+	-	+	+	+	+	-

У случају поређења метода група I и II израчуната статистика теста Wa=39 (Wb=39) није већа од горњег прага значајности, што искључује постојање статистички значајне разлике.

У поређењу методе примењене код групе I са методама код група III и IV статистика теста Wb=57 већа је од горњег критичног прага те уз наведени ризик може се запазити, да се методама група III и IV постижу значајно бољи резултати (као количници експерименталне стране пре и након реконструкције) него методом код групе I. Исто тако, на основу статистике теста Wb=57 методама примењеним код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом код групе II.

При поређењу метода група III и IV статистика теста Wb=41,5 указује на извесну супериорност групе IV у односу на групу III где је сума рангова досегла Wa=36,5 те се уочава, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између метода примењених код ових група (Табела 4.52.).

Количник вредности амплитуде експерименталне стране пре индуковане секције и након реконструкције нерва код подгрупе „Б“ приказан је табеларно (Табела 4.53).

Табела 4.53. Количник вредности амплитуде по групама подгрупе „Б“

Кунић	МЕТОД (по групама) – РАНГ							
	I	ранг-I	II	ранг-II	III	ранг-III	IV	ранг-IV
1	49,00	8,00	41,00	1,50	93,00	16,50	95,00	19,00
2	54,00	10,00	61,00	12,00	98,00	22,00	84,00	13,00
3	44,00	4,00	45,00	5,00	93,00	16,50	94,00	18,00
4	41,00	1,50	48,00	7,00	89,00	14,00	99,00	24,00
5	47,00	6,00	57,00	11,00	97,00	20,00	92,00	15,00
6	52,00	9,00	43,00	3,00	98,00	22,00	98,00	22,00
Ti	287,00	38,50	295,00	39,50	568,00	111,00	562,00	111,00
H =	17,282							
Me	48,00		46,50		95,00		94,50	

Како је израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=17,282$ већа од табличне вредности $H_{\alpha}=7,815$ (из таблице χ^2 распореда за $k-1=4-1=3$ степена слободe и при задатом ризику $\alpha=0,05$) мора се одбацити H_0 о једнакости медијана, односно ефеката у свим примењеним методама (Табела 4.53).

У овом експерименту постоји статистички значајна разлика у количницима амплитуде која се може приписати некој од метода у подгрупи "Б".

Поређења између група подгрупе „Б“ приказана су табеларно (Табела 4.54).

Табела 4.54. Амплитуда - количник леве експерименталне (након реконструкције) и леве контролне (пре секције) стране по групама подгрупе "Б"

Kruskal-Wallis $M1=M2=M3=M4$ $M1\#M2\#M3\#M4$ <i>significant level</i> ($\alpha=0,05$)	Амплитуда - количник леве постоперативне и леве преоперативне групе у подгрупи "Б" <i>Wilcoxon Wa; significant level</i> ($\alpha=0,05$); $n1=n2=6$, <i>significant interval</i> (28,50)					
	I – II $H_0: M2=M1$ $H_1: M2>M1$	I – III $H_0: M3=M1$ $H_1: M3>M1$	I – IV $H_0: M4=M1$ $H_1: M4>M1$	II – III $H_0: M3=M2$ $H_1: M3>M2$	II – IV $H_0: M4=M2$ $H_1: M4>M2$	III – IV $H_0: M4=M3$ $H_1: M4>M3$
$H=17,322$	$Wb = 39,5$ $Wa = 38,5$	$Wb = 57$	$Wb = 57$	$Wb = 57$	$Wb = 57$	$Wa = 39$ $Wb = 39$
$H_{\alpha}=3,815$	$28 < Wb < 50$	$Wb > 50$	$Wb > 50$	$Wb > 50$	$Wb > 50$	$28 < Wb < 50$
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

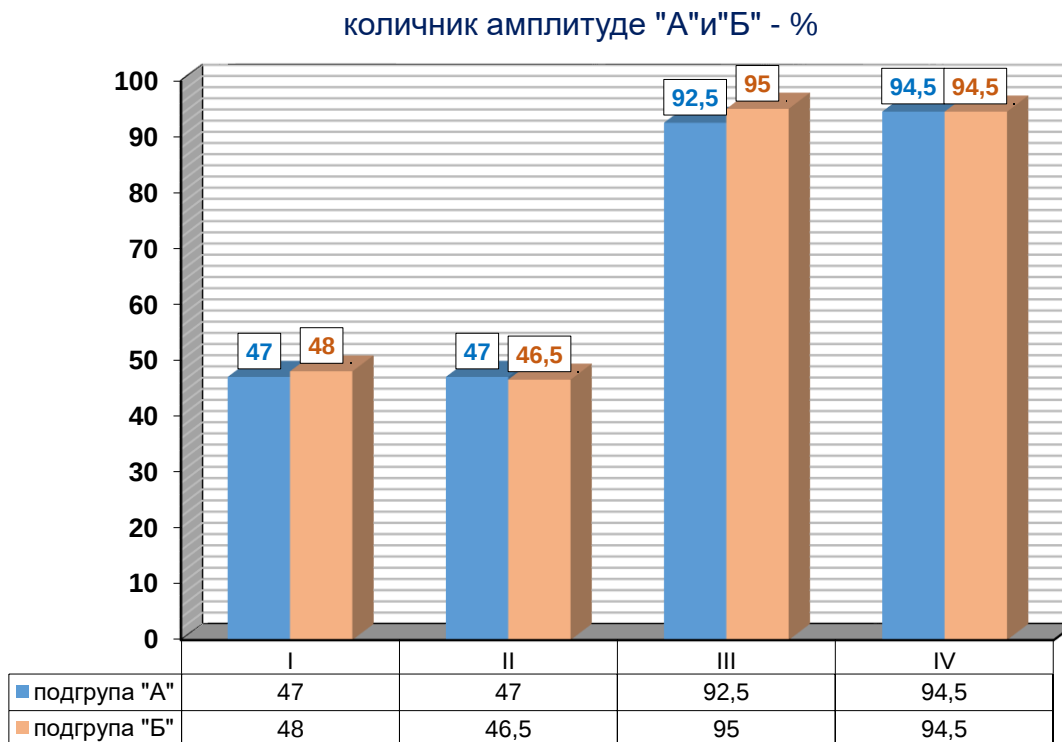
"-" – одсуство статистички значајне разлике

У случају поређења метода употребљених код група I и II израчуната статистика теста $Wa=38,5$ ($Wb=39,5$) није већа од горњег прага значајности, што искључује постојање статистички значајне разлике у ефектима између групе I и II у овој подгрупи.

У поређењу методе код групе I са методама група III и IV статистика теста $Wb=57$ већа је од горњег критичног прага па се уз наведени ризик може закључити, да се методама код група III и IV постижу значајно бољи резултати (количници експерименталне стране након реконструкције и експерименталне стране пре секције) него методом код групе I ($p<0.05$). Исто тако, на основу статистике теста $Wb=57$ методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом код групе II ($p<0.05$).

При поређењу метода код група III и IV статистика теста $Wb=39$ у групи IV указује на једнакост ефеката са групом III где је сума рангова досегла исти резултат $Wa=39$ запажа се, да не постоји статистички значајна разлика у ефектима између ових група ($p>0.05$) (Табела 4.54).

Вредности скорова подгрупа „А“ и „Б“ су сумирани и приказани процентуално на графикону (Графикон 4.10).



Графикон 4.10. Амплитуда (количник) - поређење ефеката (средњих вредности) између подгрупа "А" и "Б" (%)

Ако се зна да је за успешан опоравак повређеног фацијалног нерва неопходно да количник амплитуде здраве и повређене стране треба да износи између 70% и 95% здраве стране онда се може запазити, да су методе реконструкције примењене код III и IV групе у оквиру референтних вредности.

Код III групе подгрупе „А“ количник амплитуде експерименталне стране након реконструкције (повређена страна) износи 92,5% здраве стране (експериментална страна пре секције нерва), а код подгрупе „Б“ количник амплитуде повређене и здраве стране износи 95%. Вредности амплитуде подгрупе „А“ и подгрупе „Б“ код групе IV су идентичне и износе 94,5% здраве стране (Графикон 4.10).

Када поредимо временски опсег вредности параметара посматрања неурорегенерације нису уочене битније разлике између подгрупе „А“ и подгрупе „Б“ тако, да се може закључити, да је за процес неурорегенерације довољан период од шест недеља након репарације повређеног нерва применом плазме богате тромбоцитима.

4.3. ПАТОХИСТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ

У оквиру треће фазе истраживања шест и осам недеља након процеса реконструкције сецираног фацијалног нерва по задатим протоколима спроведена су патохистолошка мерења експерименталне (леве) и контролне (десне) стране која су обухватала наведене параметре :

1. Број новостворених аксона
 2. Степен заступљености везивног ткива
 3. Степен неоваскуларизације
 4. Број Шванових ћелија
-

Издвојене хистолошке карактеристике анализиране су у смислу објективне процене успешности регенерације оштећеног нерва у зависности од примењене методе.

Број новостворених аксона и Шванових ћелија је одређен за сваки члан ($n = 6$) све четири групе ($n = 24$) у обе подгрупе ($n = 48$) за експерименталну (леву) и контролну (десну) страну (групу).

Просек броја аксона и Шванових ћелија израчунат је као просечни број наведених хистолошких параметара два рандомизована поља сваког препарата и изражен је бројчано.

Степен заступљености везивног ткива одређен је дескрипцијом хистолошких узорака – препарата бројчано на мерној скали од 1 до 4.

1. везивно ткиво у траговима,
 2. везивно ткиво у групицама,
 3. око појединачних аксона,
 4. око групе аксона.
-

Хистолошке карактеристике стерпена неоваскуларизације приказане су на идентичан начин на мерној скали бројчано од 1 до 3.

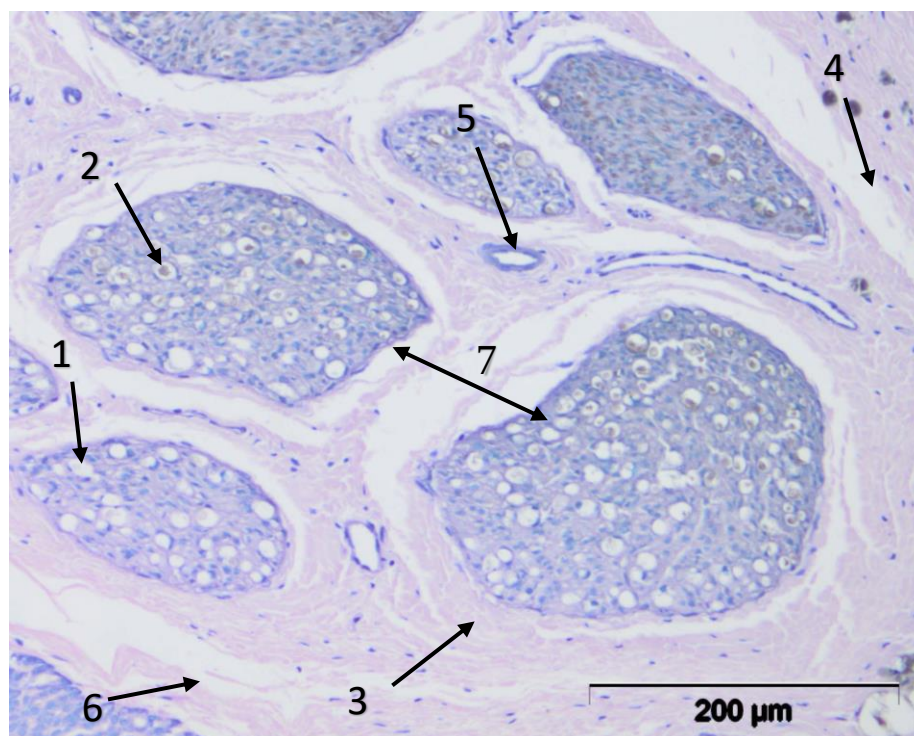
1. нема крвних судова
 2. појединачни крвни судови,
 3. мрежа крвних судова.
-

Средње вредности добијених резултата експерименталне стране свих параметара обе подгрупе су приказани табеларно (Табела 4.55).

Табела 4.55. Скорови свих хистолошких параметара подгрупа „А“ и „Б“

Патохистолошка карактеристика	Метод - група							
	I - S		II - S и FG		III - S и PRP		IV -S, FG, PRP	
	Подгрупа		Подгрупа		Подгрупа		Подгрупа	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Број новостворених аксона	22	22	26,5	26,5	86,5	88	87	89
Везивног ткива	4	3,5	3,5	3,5	2	2	2	1,5
Степен неоваскуларизације	1	1	1	1	3	3	3	3
Број Шванових ћелија	10	9,5	12	12	83,5	84	82	84

Хистолошки параметри су одређени поштујући задату методологију, резултати су статистички обрађени и приказани у оквиру обе подгрупе за експерименталну и контролни страну (групу) на основу анализирања хистолошких препарата нерва. Приказан је попречни пресек дела фацијалног нерва кунића контролне (десне) стране (Слика 4.2).



Слика 4.2. Приказ попречног пресека фацијалног нерва кунића (*toluidin-blue*)

1. аксон, 2. Шванова ћелија 3. епинеуријум, 4. перинеуријум, 5. крвни суд, 6. везивно ткиво, 7. нервни фасцикулуси

4.3.1. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈА АКСОНА (подгрупе „А“ и „Б“)

Након припреме хистолошких препарата број аксона израчунат је као просечни број аксона два рандомизована поља сваког препарата при микроскопском увећању 400х, величине поља 250 x 250 μm и изражен је бројчано.

Наведена методологија пребројавања новостворених аксона спроведена је код свих група подгрупа „А“ и „Б“ за експерименталну (леву) и контролну (десну) страну. Скорови средњих вредности су приказани табеларно (Табела 4.56).

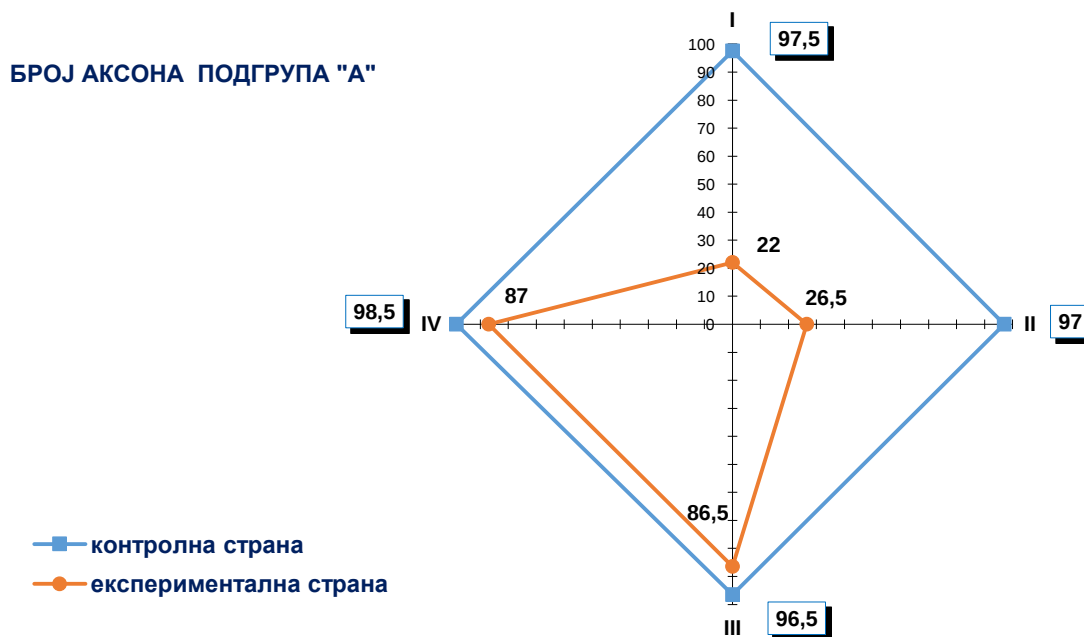
Табела 4.56. Скорови броја аксона по групама обе подгрупе леве и десне стране

БРОЈ АКСОНА	I		II		III		IV	
(средња вредност)	подгрупа		подгрупа		подгрупа		подгрупа	
	A	Б	A	Б	A	Б	A	Б
ЛЕВА СТРАНА	22	22	26,5	26,5	86,5	88	87	89
ДЕСНА СТРАНА	97,5	97	97	97,5	96,5	96,5	98,5	99

леви фацијални нерв - експериментална страна

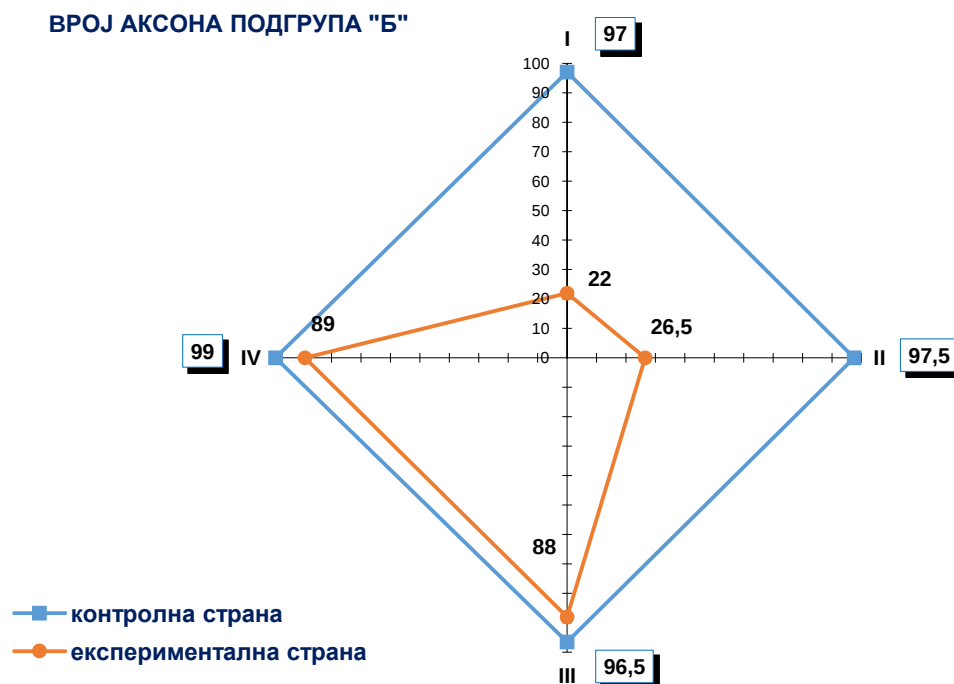
десни фацијални нерв - контролна страна

На радар дијаграму ефеката у простору медијана резултата броја новостворених аксона подгрупе „А“ у зависности од примењене методе експерименталне (леве) и контролне (десне) стране примећује се, да најближе вредности контролној страни имају методе примењене код експерименталних група III и IV (Графикон 4.11).



Графикон 4.11. Поређење ефеката примењених метода и резултата контролне групе са групама у подгрупи „А“ у погледу броја новостворених аксон

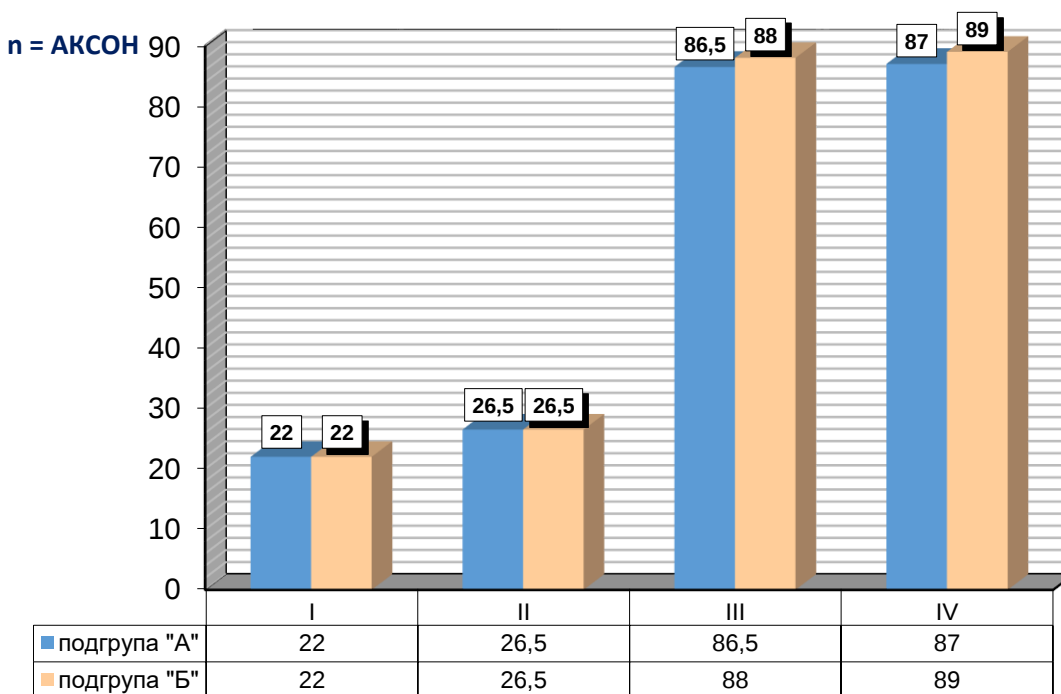
На радар дијаграму ефеката у простору параметара локације, медијана резултата новостворених аксона подгрупе „Б“ у зависности од примењене методе и резултата измерених у контролној групи (страни) запажа се, да су вредности експерименталних група III и IV подгрупе „Б“ још ближе оним у контролној групи, него што је исказано у подгрупи „А“ (Графикон 4.12).



Графикон 4.12. Поређење ефеката примењених метода и резултата контролне групе са групама у подгрупи „Б“ у погледу броја новостворених аксона

Како нису нађене битне статистичке значајности разлика између подгрупа „А“ и „Б“, када је у питању контролна страна није било потребно правити компарацију резултата између наведених подгрупа .

Након одређивања броја аксона скорови код експерименталне (леве) стране обе подгрупе су сумирани по групама и упоређени, а резултати су приказани графички у зависности од временског опсега параметара посматрања (подгрупе „А“ и „Б“) (Графикон 4.13).



Графикон 4.13. Број новостворених аксона – сумирани резултати подгрупа „А“ и „Б“

На хистограму скорова се запажа, да највеће скорове у погледу броја новостворених аксона у подгрупама „А“ и „Б“ бележе методе примењене код група III и IV, јер се запажа приближно четири пута више новостворених аксона него код група I и II, што наговештава њихову супериорност у ефектима када је у питању ова хистолошка карактеристика у односу на примењене методе код група I и II (Графикон 4.13).

Односи који се уочавају на наведеном графикону у наставку су тестирани методама статистичке анализе прилагођеним природи проблема, односно примењена је *Kruskal-Wallis-ova* статистика и *Mann-Whitney-Wilcoxon-ov* (Wa) тест суме рангова за поређење метода свих група у подгрупама „А“ и „Б“, како би се одредиле оне методе које бележе статистички значајно боље резултате од осталих (Табеле 4.57, 4.58).

Табела 4.57. *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney-Wilcoxon-ov* тест утврђивања парова узорака између којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу броја новостворених аксона - подгрупа „А“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Број новостворених аксона Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28, 50)					
	II – I	III – I	IV – I	III – II	IV – II	IV – III
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=19,248	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 41
$H_v=3, \alpha < 7,815$	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	28 < Wa < 50
+	+	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

" - " – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=19,248$ је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ (при $\alpha=0,05$), стога се може одбацити H_0 о једнакости медијана у свим примењеним методама у корист H_1 , да постоји статистички значајна разлика у броју новостворених аксона за коју је одговорна нека од примењених метода.

Израчунате статистике теста W_a у случајевима поређења спроведених метода код група II, III и IV са методом код групе I износе $W_a = 57$ веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - *significant level* $\alpha=0,05$ и узорцима једнаке величине $n_1 = n_2 = 6$) па уз наведени ризик α морамо одбацити H_0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H_1 запажамо, да се методама примењеним код група II, III и IV постижу значајно бољи резултати него методом групе I ($p < 0.05$).

Исто тако, примењеним методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом групе II ($p < 0.05$). При поређењу метода група III и IV статистика теста W_a се нашла унутар интервала прагова значајности те се мора прихватити H_0 , да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика у ефектима поређења метода група III и IV ($p > 0.05$) (Табела 4.57).

Табела 4.58. *Kruskal-Wallis i Mann-Whitney-Wilcoxon-ov* тест утврђивања парова узорака између којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу броја новостворених аксона - подгрупа „Б“

Kruskal-Wallis $M_1=M_2=M_3=M_4$ $M_1\#M_2\#M_3\#M_4$ <i>significant level</i> ($\alpha=0,05$)	Број новостворених аксона <i>Wilcoxon</i> W_a ; <i>significant level</i> ($\alpha=0,05$); $n_1=n_2=6$, <i>significant interval</i> (28, 50)					
	II – I	III – I	IV – I	III – II	IV – II	IV – III
	$H_0: M_2=M_1$ $H_1: M_2>M_1$	$H_0: M_3=M_1$ $H_1: M_3>M_1$	$H_0: M_4=M_1$ $H_1: M_4>M_1$	$H_0: M_3=M_2$ $H_1: M_3>M_2$	$H_0: M_4=M_2$ $H_1: M_4>M_2$	$H_0: M_4=M_3$ $H_1: M_4>M_3$
$H=19,093$	$W_a = 55$	$W_a = 57$	$W_a = 57$	$W_a = 57$	$W_a = 57$	$W_a = 43$
$H_v=3, \alpha < 7,815$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$28 < W_a < 50$
+	+	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

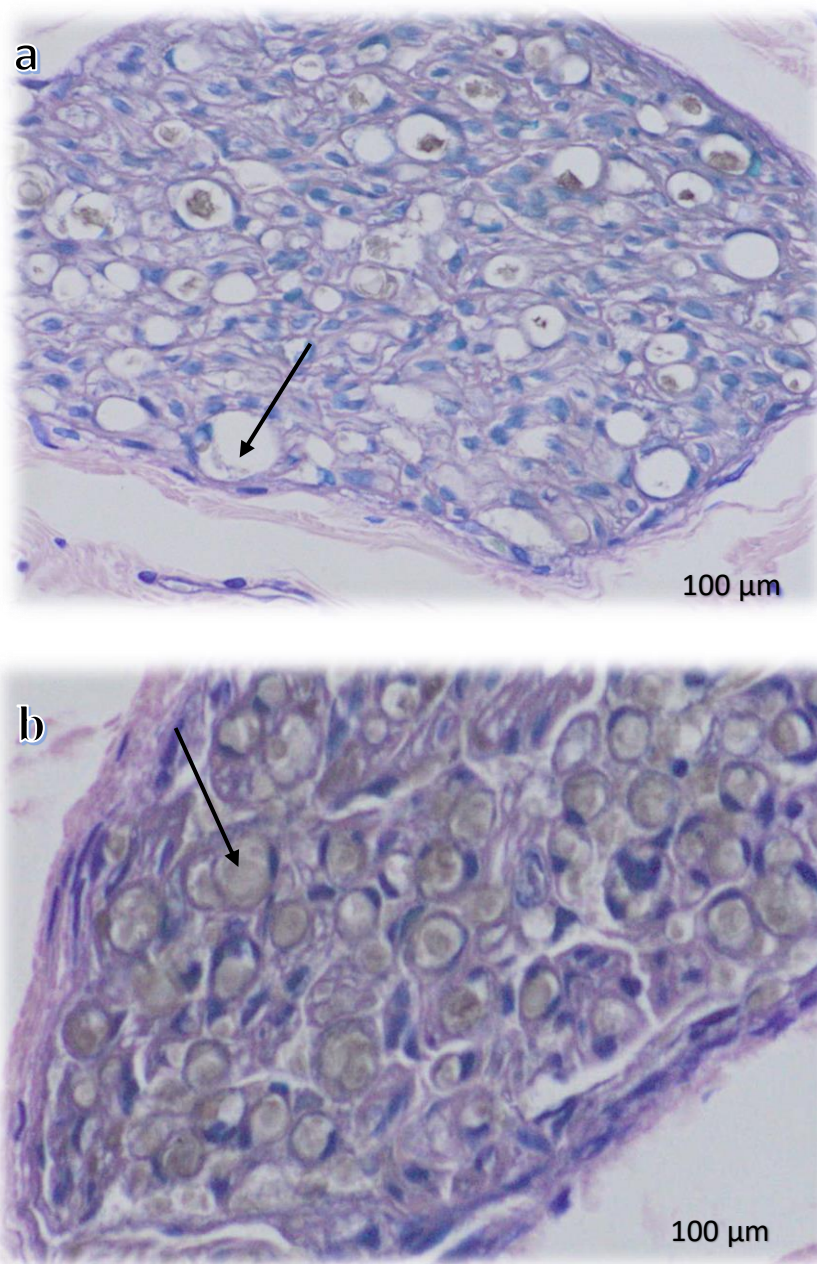
"-" – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=19,093$ је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ (ризик $\alpha=0,05$) те са наведеним ризиком прихватимо H_1 , да постоји статистички значајна разлика у броју новостворених аксона за коју је одговорна нека од метода. Како се израчунате статистике теста W_a у подгрупи „Б“ минорно разликују од оних у подгрупи „А“, закључак је истоветан као и за подгрупу „А“ и указује на супериорност метода група III и IV између којих не постоји статистички значајна разлика ($p > 0.05$) (Табела 4.58).

Број аксона, као и све хистолошке карактеристике посматрања у овој студији су изведене на основу резултата добијених дескрипцијом вредности задатих параметара по утврђеној методи (видети методологију истраживања) добијених посматрањем хистолошких препарата помоћу одређених технике бојења (*toludin-blue*, *luxol fast blue*, *Masson-Goldner*, *hematoxin-eosin*), високософистицираним и прилагођеним нервном ткиву.

Издвојени су репрезентативни узорци по групама и приказани у даљем раду.

На попречном пресеку хистолошких препарата *toludin-blue* бојењем приказан је број аксона по групама експерименталне и контролне стране. Као репрезентативни узорци приказани су препарати код II и III експерименталне групе подгрупе „А” где се тражене хистолошке карактеристике јасно диференцирају (Слика 4.3. а,б).



Слика 4.3. Приказ броја аксона група II (а) и III (б) подгрупе „А“ (*toludin-blue*) попречни пресек (*cross-section*)

На попречном пресеку хистолошког препарата (Слика 4.3.a) групе II бојеним са *toludin-blue* при увећању од 400 х, уочава се мањи број Шванових ћелија, које се презентују у виду тамних ограничених прстенова, који окружују новостворене аксоне приказане у виду бледих ограничених поља са оскудним мијелинизованим подручјем између истих.

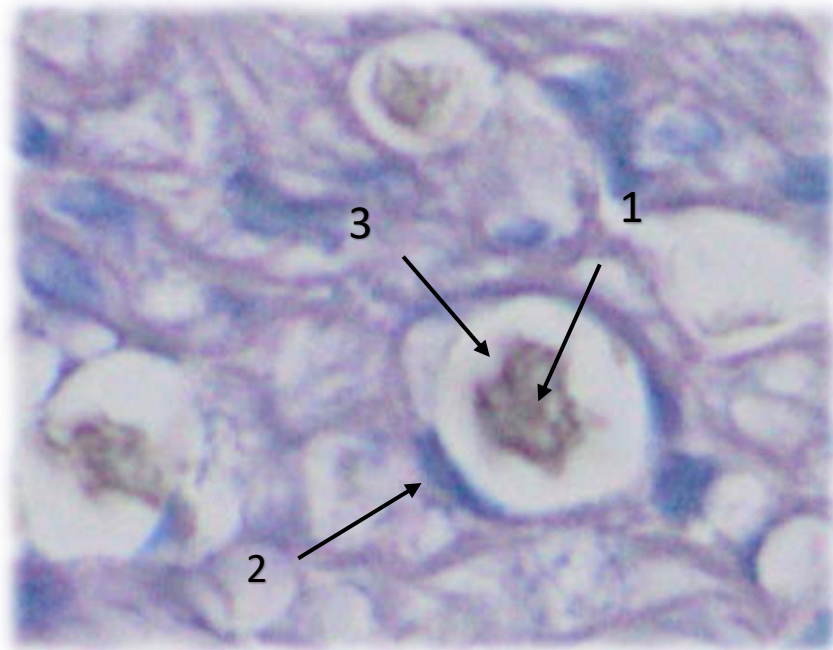
Запажамо већи број немијелизованих аксона без Шванових ћелија (црна стрелица). Већа подручја везивног ткива у виду бледо розих трака, како у интрафасцикуларном простору тако и између аксона указују на успорену неурорегенерацију.

Овакав налаз хистолошког препарата указује на слабу неурорегенерацију, што ову методу лимитира у даљем процесу опоравка нерва.

На попречном пресеку хистолошког препарата (Слика 4.3.b) групе III при бојењу са *toludin-blue* и увећању од 400х, запажа се велики број Шванових ћелија као тамних прстенастих формација које окружују новостворене аксоне (црна стрелица).

Мијелински омотачи се приказују као интензивно плаве зоне са примесом љубичасте боје. Везивно ткиво у облику тракастих бледоплавих зона се уочава у траговима између појединачних аксона.

На слици 4.3.a, приказани су немијелизовани аксони као „празна поља“ без Шванових ћелија, док на слици 4.3.b, Шванове ћелије обавијају новостворене аксоне. Процес мијелинизације условљавају Шванове ћелије, а самим тим утичу и на опоравак нерва (Слика 4.4.)



Слика 4.4. Процес мијелинизације 1. Аксон , 2. Шванове ћелије (једро), 3. Мијелин

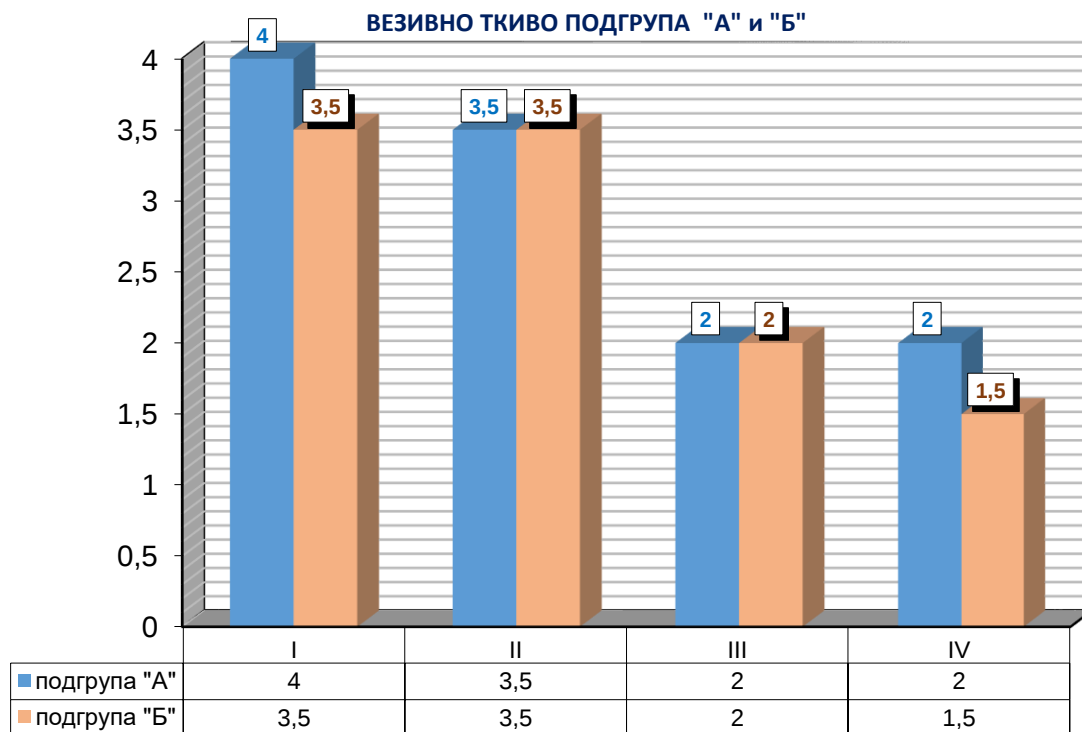
1.3.2. ОДРЕЂИВАЊЕ СТЕПЕНА ЗАСТУПЉЕНОСТИ ВЕЗИВНОГ ТКИВА

(подгрупе „А“ и „Б“)

Степен заступљености везивног ткива је одређен по утврђеној методи на основу површине коју заузима на сваком препарату ткива са утврђеним системом бодовања бројчано од 1 до 4 (1- у траговима заузима мање од 20% површине пресека нерва, 2- у групицама заузима од 20- 50 %, 3 - око појединачних аксона заузима од 50-80%, 4 - око већег броја аксона заузима више од 80% површине пресека нерва).

Битно је напоменути, да у овом делу експеримента мањи број на мерној скали од 1 до 4 представља супериорнију методу у процесу неурорегенерације, односно мања бројчана вредност означава и мањи степен присуства везивног ткива, а самим тим и одсуство инфламаторног процеса чиме се постижу бољи резултат у процесу регенерације нерва.

Степен заступљености везивног ткива одређен је дескрипцијом узорака бројчано од 1 до 4 код обе подгрупе и приказан графички (Графикон 4.14).



Графикон 4.14. Степен заступљености везивног ткива - хистограм параметра локације (медијане) подгрупе „А“ и „Б“

1-1,5 = 20%, 2= 20-50%, 3-3,5= 50-80%, 4 >80% (заступљеност везивног ткива у односу на површину пресека нерва изражена у процентима)

На хистограму се лако може уочити да и у погледу степена заступљености везивног ткива најбоље резултате у подгрупама „А“ и „Б“ бележе методе употребљене код група III и IV (20% захваћености везивним ткивом), што такође наговештава њихову супериорност у ефектима када је у питању ова хистолошка карактеристика у односу на методе група I и II (преко 80% присуства везивног ткива) (Графикон 4.14).

У наставку експеримента упоређени су резултати међу експерименталним групама за обе подгрупе.

Kruskal-Wallis и *Mann-Whitney-Wilcoxon-ov* тестом упоређени су парови узорака међу групама код којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу степена заступљености везивног ткива код подгрупе „А“ (Табела 4.59).

Табела 4.59. Упоредба вредности степена заступљености везивног ткива по групама подгрупе „А“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Степен заступљености везивног ткива Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28,50)					
	II – I	III – I	IV – I	III – II	IV – II	IV – III
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=17,520	Wa = 45	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 39
$H_v=3, \alpha<7,815$	28<Wa<50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	28<Wa<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике H=17,520 је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ (ризик $\alpha=0,05$) те са наведеним ризиком се прихвата H1, да постоји статистички значајна разлика у степена заступљености везивног ткива код примењених метода реконструкције.

Израчунате статистике теста Wa при поређењу метода код група III и IV са методом групе I као и при поређењу метода група III и IV са групом II износе Wa=57 веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - significant level $\alpha=0,05$ и узорцима једнаке величине n1= n2 =6) уз наведени ризик α мора се одбацити H0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H1, односно методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом група I и II ($p<0.05$).

Поређењем метода група I и II као и метода група III и IV статистика теста Wa нашла се унутар интервала прагова значајности те се прихвата H0, да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика када се пореде ефекти метода група III и IV ($p>0.05$) (Табела 4.59.).

Kruskal-Wallis i Mann-Whitny-Wilcoxon-ov тестом упоређене су и парови узорака међу групама код којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу степена заступљености везивног ткива код подгрупе „Б“ (Табела 4.60).

Табела 4.60. Упоређивање вредности степена заступљености везивног ткива по групама подгрупе „Б“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 сигнифицант левел ($\alpha=0,05$)	Степен заступљености везивног ткива Wilcoxon Wa; <i>significant level</i> ($\alpha=0,05$); $n1=n2=6$, <i>significant interval</i> (28,50)					
	II – I	III – I	IV – I	III – II	IV – II	IV – III
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
H=17,580	Wa = 45	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 42
$H_{v=3, \alpha} < 7,815$	28<Wa<50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	28<Wa<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

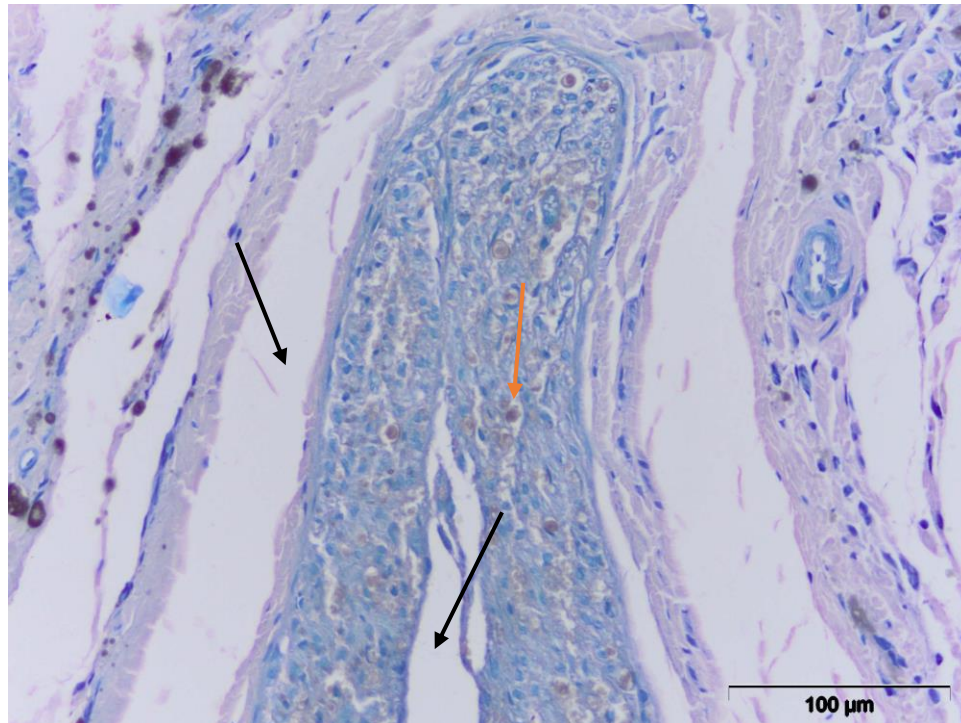
"-" – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=17,580$ је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ (ризик $\alpha = 0,05$), стога уз наведени ризик прихвата се H_1 , да постоји статистички значајна разлика у степену заступљености везивног ткива за коју је одговорна нека од метода. Израчунате статистике теста Wa при поређењу ефеката метода група III и IV са методом групе I као и при поређењу ефеката метода код група III и IV са групом II износе $Wa=57$ веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - *significant level* $\alpha =0,05$ и узорцима једнаке величине $n1= n2 =6$), дакле уз наведени ризик α одбацује се H_0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H_1 .

Методама код група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом код група I и II ($p<0.05$). Поређењем метода група I и II као и метода група III и IV статистика теста Wa нашла се унутар интервала прагова значајности, зато се прихвата H_0 , да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика када се пореде ефекти метода група III и IV ($p>0.05$) (Табела 4.60).

Добијени статистички резултати су произашли из хистолошких анализа препарата на основу параметара посматрања описаних метода по групама.

Заступљености везивног ткива је један од прогностички знакова неурорегенерације, већа заступљеност везивног ткива указује и на присутну инфламацију, а самим тим и успорен процес регенерације (Слика 4.5).

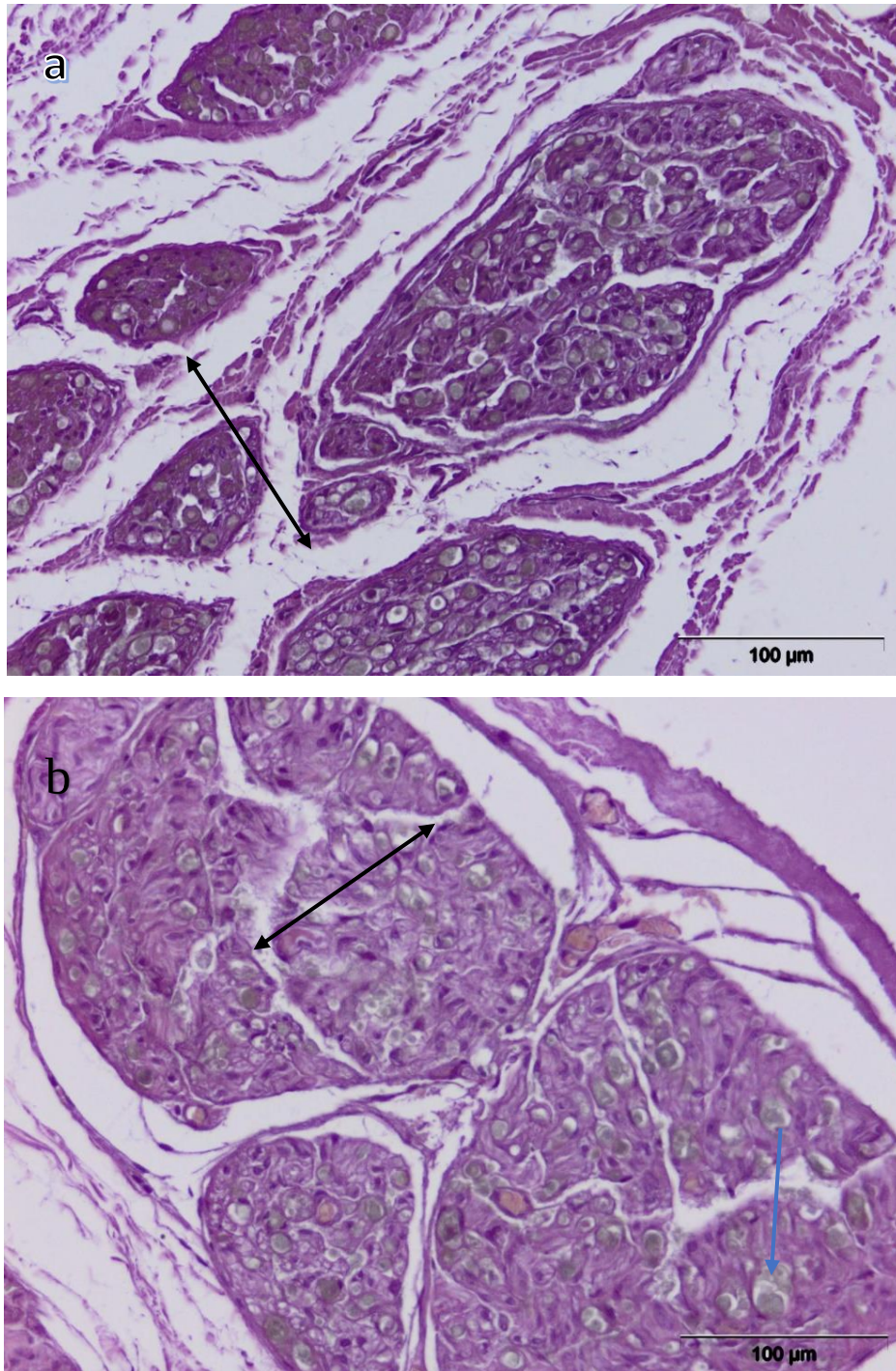


Слика 4.5. Приказ везивног ткива група I (toludin-blue) уздужни пресек (longitudinal-section)

На уздужном пресеку хистолошког препарата групе I подгрупе „А“ бојеним *toludin-blue* методом при увећању од 400х, запажене су малобројне Шванове ћелије са дискретним пољима мијелина (тамна поља-жута стрелица) и обиљем везивног ткива (бледороза подручја-црна стрелица) у интерфасцикуларном простору које представља инфламаторни одговор у ткиву.

Јако мали број аксона и велико немијелизовано подручје са присутном инфламацијом успорава процес регенерације нерва.

На попречном пресеку хистолошких препарата група II и III подгрупе „А“ бојених хематоксин-еозином при увећању од 400х, приказани су параметри посматрања карактеристични за процену неурорегенерације са посебним освртом на степен заступљености везивног ткива (Слика 4.6. а , b).



Слика 4.6. Приказ везивног ткива II и III група подгрупа „А“ (*hematoxin-eosin*) - попречни пресек (*cross-section*)

На попречном пресеку хистолошког препарата при увећању 400х, код групе II подгрупе „А“ (слика 4.5. а) видљиво је доминантно везивно ткиво које се боји светло розе бојом у интерфасцикуларном простору, као и између новоформираних аксона (Слика 4.6. а - црна стрелица).

Број Шванових ћелија које окружују аксоне је оскудан, као и број новостворених аксона. Све то условљава слабу продукцију мијелина са великим плажама немијелинизованог подручја. Статистичким анализама је потврђено да код групе II заступљеност везивног ткива на хистолошком препарату износи око осамдесет процената површине пресека нерва (Табела 4.15.).

Велике површине везивног ткива са оскудним Швановим ћелијама и демијелинизованим подручјем указују на неадекватан неурорегенеративни одговор примењеном методом реконструкције.

На хистолошком препарату дела фацијалног нерва (Слика 4.6.b), код III групе подгрупе „А“ при истом увећању, запажа се велики број Шванових ћелија у виду тамних поља унутар фасцикулуса нерва које окружују новостворене аксоне (Слика 4.6. b – плава стрелица).

Поља мијелина обојена тамнољубичасто су заступљена у високом проценту са оскудним везивним ткивом у интерфасцикуларним просторима. Оскудно везивно ткиво указује на убрзан процес регенерације уз смањену инфламаторну компоненту (Слика 4.6.b – црна стрелица).

Заступљеност везивног ткива испод двадесет процената површине пресека нерва указује на висок степен неурорегенерације (Табела 4.15).

Запажају се наглашени параметри успешне регенерације нерва када је реч о заступљености везивног ткива код групе III.

4.3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ СТЕПЕНА НЕОВАСКУЛАРИЗАЦИЈЕ (подгрупе „А“ и „Б“)

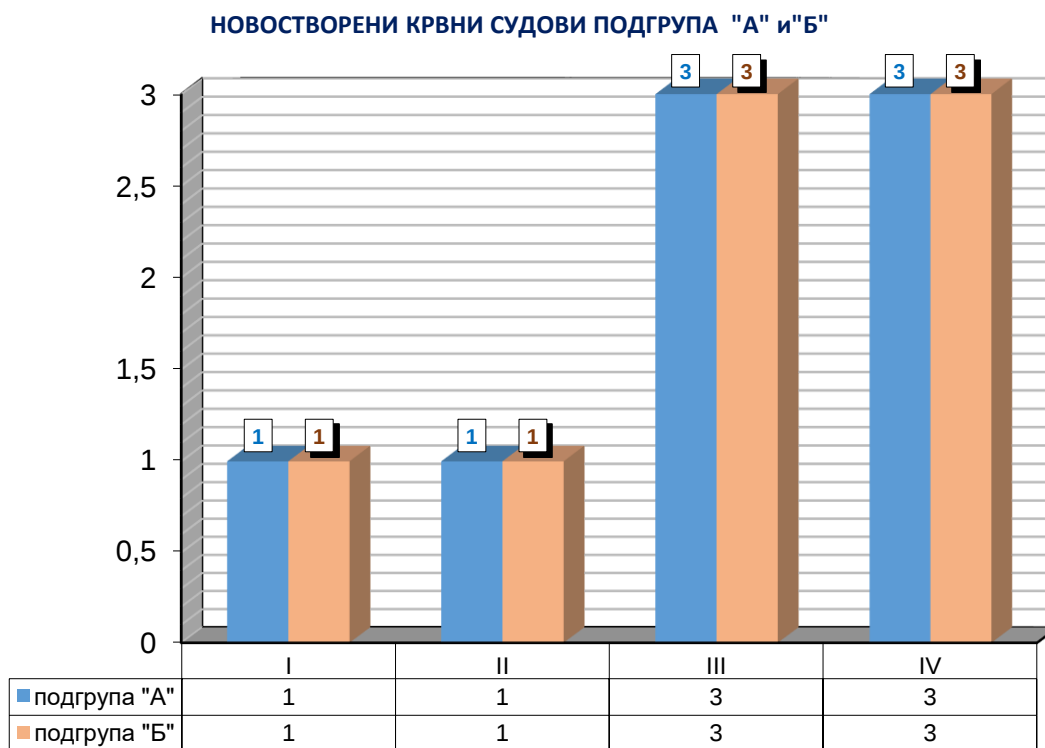
Ендонеуријумски капилари пружају се лонгитудинално дуж нерва, дакле паралелно са аксонима. Исто тако, залазе и трансверзално, формирајући грацилну мрежу око групица мијелинских аксона.

Степен неоваскуларизације одређен је дескрипцијом хистолошких узорака површине који заузимају новоформирани крвни судови на посматраном пресеку нерва и приказан оценама од 1-3

1-нема крвних судова; 2-појединачни крвни судови заузимају до 50 % површине пресека нерва; 3-мрежа крвних судова заузимаја више од 50% површине пресека нерва

Већи број је еквивалент већој процентуалној заступљености новоформираних крвних судова и пропорционалан је успешности неурорегенерације.

Сумирани резултати неоваскуларизације су приказани бројчано на нумеричкој скали од 1 до 3 за експерименталну и контролну страну свих група у обе подгрупе (Графикон 4.15).



Графикон 4.15. Степен неоваскуларизације - (медијане) „А“ и „Б“ подгрупе

На хистограму се лако може уочити да и у погледу степена неоваскуларизације најбоље резултате у подгрупама „А“ и „Б“ бележе методе група III и IV што, такође наговештава њихову супериорност у ефектима када је у питању ова хистолошка карактеристика (Графикон 4.15.).

У даљем поступку статистичке обраде примењен је *Kruskal-Wallis i Mann-Whitney-Wilcoxon* -ов тест утврђивања парова узорака између којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу степена неоваскуларизације међу групама, код подгрупа „А“ и „Б“ (Табеле 4.61 , 4.62).

Табела 4.11. Упоређивање степена неоваскуларизације по групама код подгрупе „А“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Степен неоваскуларизације Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28,50)					
	II – I H0: M2=M1 H1: M2>M1	III – I H0: M3=M1 H1: M3>M1	IV – I H0: M4=M1 H1: M4>M1	III – II H0: M3=M2 H1: M3>M2	IV – II H0: M4=M2 H1: M4>M2	IV – III H0: M4=M3 H1: M4>M3
X=15,375	Wa = 42	Wa = 56,5	Wa = 56	Wa = 56	Wa = 55	Wa = 36
$H_v=3, \alpha < 7,815$	28<Wa<50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	28<Wa<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=15,375$ је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ па се уз ризик $\alpha=0,05$ прихвата H_1 , да постоји статистички значајна разлика у степена заступљености везивног ткива за коју је одговорна нека од метода.

Израчунате статистике теста W_a при поређењу метода примењених код група III и IV са методом код групе I као и при поређењу метода група III и IV са групом II веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - *significant level* $\alpha=0,05$ и узорцима једнаке величине $n_1=n_2=6$), стога уз наведени ризик α мора се одбацити H_0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H_1 , тј. да се методама група III и IV постижу значајно бољи резултати него методама група I и II ($p<0.05$).

Поређењем метода група I и II, као и метода група III и IV статистика теста W_a нашла се унутар интервала прагова значајности те се прихвата H_0 , да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика када се пореде ефекти метода наведених група (I и II) и (III и IV) ($p>0.05$) (Табела 4.61).

Табела 4.62. Упоређивање степена неоваскуларизације по групама код подгрупе „Б“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Степен неоваскуларизације Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28,50)					
	II – I H0: M2=M1 H1: M2>M1	III – I H0: M3=M1 H1: M3>M1	IV – I H0: M4=M1 H1: M4>M1	III – II H0: M3=M2 H1: M3>M2	IV – II H0: M4=M2 H1: M4>M2	IV – III H0: M4=M3 H1: M4>M3
X=15,952	Wa = 42	Wa = 56,5	Wa = 56,5	Wa = 56	Wa = 56	Wa = 39
H _v =3, α <7,815	28<Wa<50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	28<Wa<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

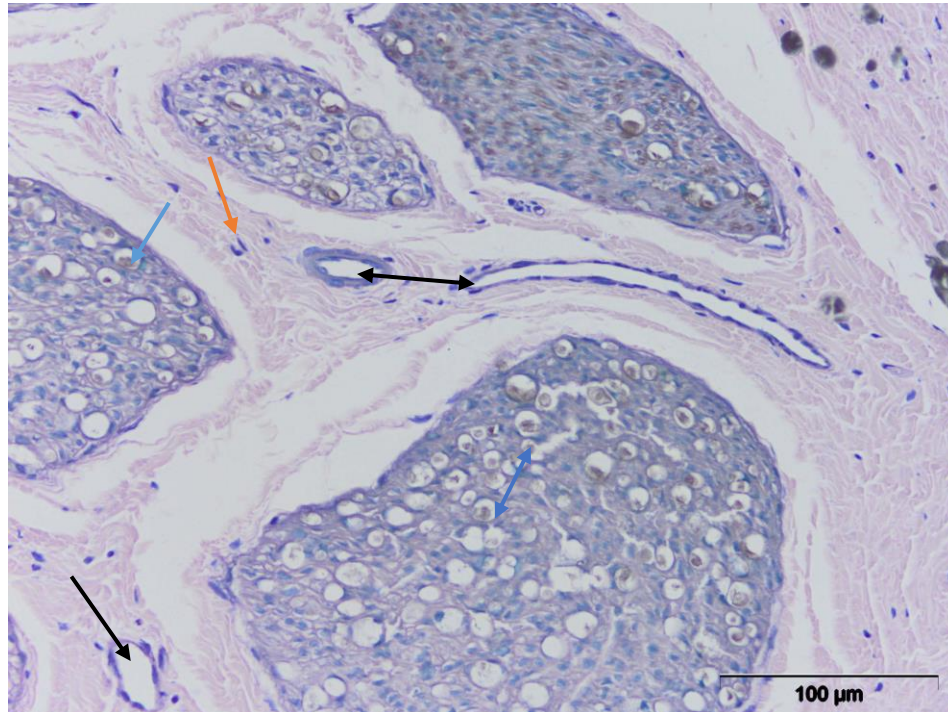
Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=15,952$ је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ те уз ризик $\alpha=0,05$ прихвата се H_1 , да постоји статистички значајна разлика у степена заступљености везивног ткива за коју је одговорна нека од метода.

Израчунате статистике теста Wa при поређењу метода група III и IV са методом групе I као и при поређењу метода група III и IV са групом II веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - *significant level* $\alpha=0,05$ и узорцима једнаке величине $n_1=n_2=6$), зато уз наведени ризик α одбацује се H_0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H_1 , односно, методама група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом група I и II ($p<0.05$).

Поређењем метода група I и II као и метода група III и IV статистика теста Wa нашла се унутар интервала прагова значајности, стога се мора прихватити H_0 , да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика када се пореде ефекти метода наведених група (I и II) и (III и IV) ($p>0.05$) (Табела 4.62).

Статистички резултати су настали након анализе хистолошких препарата по наведеним методама, а као такви приказани по групама.

Хистолошки параметри посматрања осликавају квалитет неурорегенерације, а један од параметара успешне неурорегенерације је и висок степен неоваскуларизације (Слика 4.7.).



Слика 4.7. Приказ неоваскуларизација група III (*toludin-blue*) попречни пресек
(*cross-section*)

На попречном пресеку хистолошког препарата групе III подгрупе „А“ при *toludin-blue* бојењу уочава се већи број новостворених крвних судова у облику интрафасцикуларне интранеуралне васкуларне мреже, доминантно у епинеуријуму и ендонеуријуму при чему се детектују крвни судови већег волумена, артериоле и венуле (Слика 4.6 - црна стрелица), као и крвни судови мањег промера - капилари (Слика 4.6 - жута стрелица).

Унутар фасцикулуса видљиви су новоформирани аксони са Швановим ћелијама и доста мијелина (Слика 4.6. плава стрелица), као и оскудно везивно ткиво.

4.3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈА ШВАНОВИХ ЋЕЛИЈА (подгрупе „А“ и „Б“)

Број Шванових ћелија је одређен нумерички по утврђеној методи (видети методологију) за обе подгрупе експерименталне (леве) и контролне (десне) стране, а добијене средње вредности су приказане табеларно (Табела 4.63).

Табела 4.63. Скорови броја Шванових ћелија

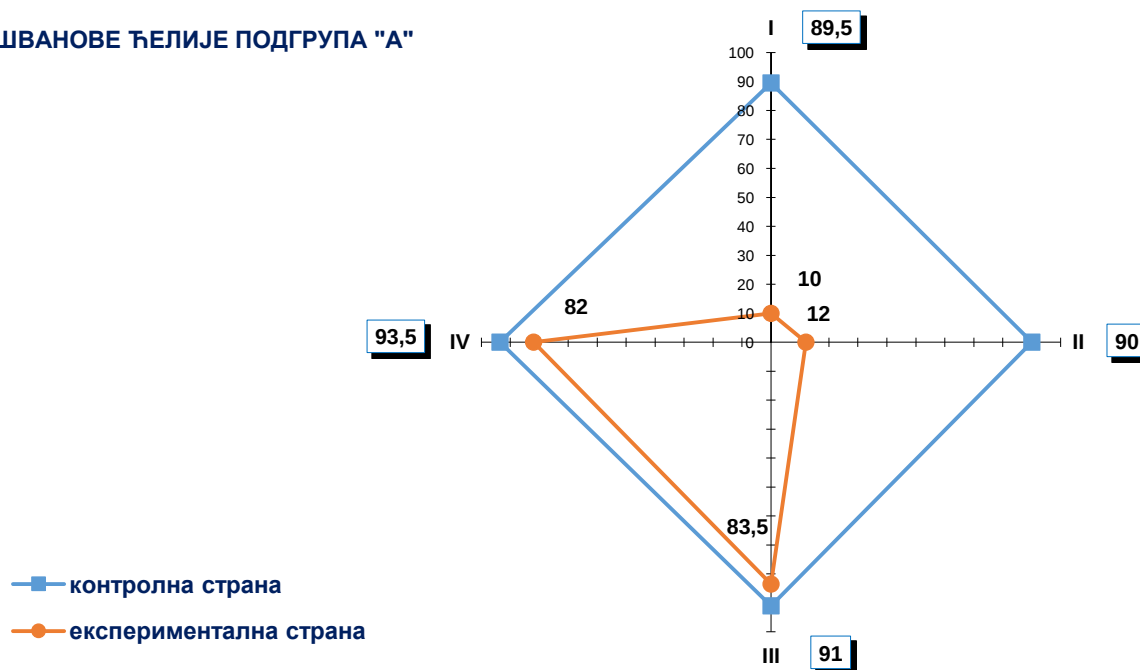
БРОЈ ШВАНОВИХ ЋЕЛИЈА	I		II		III		IV	
(средња вредност)	подгрупа		подгрупа		подгрупа		подгрупа	
	A	Б	A	Б	A	Б	A	Б
ЛЕВА СТРАНА	10	9,5	12	12	83,5	84	82	84
ДЕСНА СТРАНА	89,5	89,5	90	90	91	92,5	93,5	93,5

лева – експериментална страна (група)

десна - контролна страна (група)

На радар дијаграму медијана резултата броја Шванових ћелија подгрупе „А“ у зависности од примењене методе скорови детектовани у експерименталним (лева страна) групама III и IV најприближнији су вредностима контролних група (десна страна), што потврђује њихову већу ефикасност у односу на методе примењене код група I и II чији скорови су знатно нижи у односу на контролне групе (Графикон 4.16.).

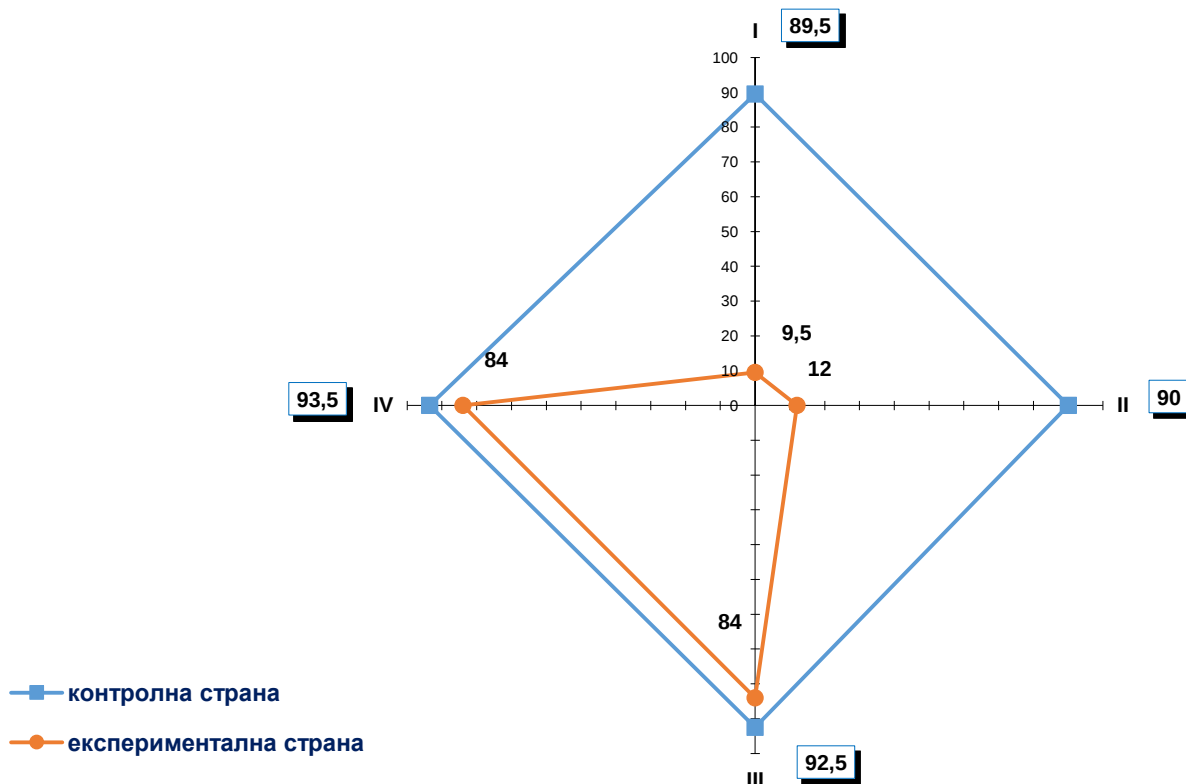
ШВАНОВЕ ЋЕЛИЈЕ ПОДГРУПА "А"



Графикон 4.16. Поређење ефеката примењених метода и резултата експерименталних и контролних група подгрупе „А“ у погледу броја Шванових ћелија

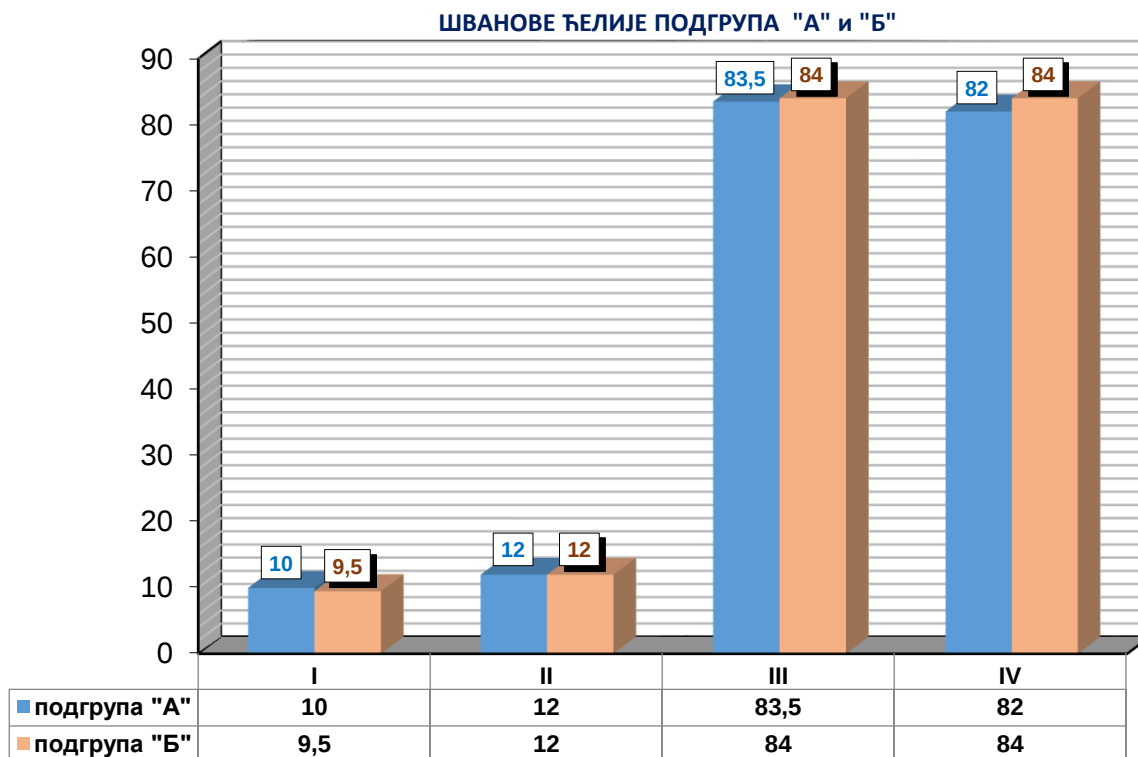
На радар дијаграму медијана ефеката примењених метода и резултата измерених у контролним и експерименталним групама подгрупе „Б“ најближе вредности контролним групама детектују се код метода група III и IV, односно вредности су готово изједначене за разлику од метода примењених код група I и II чији ефекти су знатно слабији у односу на контролне групе (Графикон 4.17).

ШВАНОВЕ ЋЕЛИЈЕ ПОДГРУПА "Б"



Графикон 4.17. Поређење ефеката примењених метода и резултата експерименталних и контролних група у подгрупи „Б“ у погледу броја Шванових ћелија

Средња вредност скорова Шванових ћелија експерименталне стране одређена на основу хистолошких мерења изражена је бројчано код свих група, обе подгрупе и приказана графички (Графикон 4.18)



Графикон 4.18. Приказ броја Шванових ћелија - подгрупа „А“ и „Б“ .

На хистограму параметара локације (медијане) се уочава да у погледу броја Шванових ћелија најбоље резултате у подгрупама „А“ и „Б“ бележе методе примењене код група III и IV, што указује на њихову супериорност у ефектима када је у питању ова хистолошка карактеристика (Графикон 4.18.).

Kruskal-Wallis и *Mann-Whitny-Wilcoxon* -ov тестом утврђени су парови узорака између којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу броја Шванових ћелија међу групама подгрупе „А“ (Табела 4.64).

Табела 4.64. Поређење број Шванових ћелија по групама подгрупе „А“

Kruskal-Wallis M1=M2=M3=M4 M1#M2#M3#M4 significant level ($\alpha=0,05$)	Број Шванових ћелија Wilcoxon Wa; significant level ($\alpha=0,05$); n1=n2=6, significant interval (28,50)					
	II – I	III – I	IV – I	III – II	IV – II	IV – III
	H0: M2=M1 H1: M2>M1	H0: M3=M1 H1: M3>M1	H0: M4=M1 H1: M4>M1	H0: M3=M2 H1: M3>M2	H0: M4=M2 H1: M4>M2	H0: M4=M3 H1: M4>M3
X=17,608	Wa = 46	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 57	Wa = 38,5
H _v =3, α <7,815	28<Wa<50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	Wa > 50	28<Wa<50
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis*-ove статистике H=17,608 је већа од табличног прага значајности H_v=7,815 те уз ризик $\alpha=0,05$ прихва се H₁, да постоји статистички значајна

разлика у степену заступљености Шванових ћелија за коју је одговорна нека од примењених метода.

Израчунате статистике теста W_a при поређењу метода примењених код група III и IV са методом групе I као и при поређењу метода код група III и IV са групом II износе $W_a=57$, веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - *significant level* $\alpha=0,05$ и узорцима једнаке величине $n_1=n_2=6$), дакле уз наведени ризик α мора се одбацити H_0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H_1 , тј. да се методама група III и IV постижу значајно бољи резултати него методом група I и II ($p<0.05$). Поређењем метода група I и II као и метода група III и IV статистика теста W_a нашла се унутар интервала прагова значајности, стога се прихвата H_0 , да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика када се пореде ефекти ових метода ($p>0.05$) (Табела 4.64).

Kruskal-Wallis i Mann-Whitny-Wilcoxon -ов тестом утврђени су парови узорака између којих постоји статистички значајна разлика у ефектима у погледу броја Шванових ћелија међу групама подгрупе „Б“ (Табела 4.65).

Табела 4.65. Поређење броја Шванових ћелија по групама подгрупе „Б“

Kruskal-Wallis $M_1=M_2=M_3=M_4$ $M_1\#M_2\#M_3\#M_4$ <i>significant level</i> ($\alpha=0,05$)	Број Шванових ћелија Wilcoxon W_a ; <i>significant level</i> ($\alpha=0,05$); $n_1=n_2=6$, <i>significant interval</i> (28,50)					
	II – I	III – I	IV – I	III – II	IV – II	IV – III
	$H_0: M_2=M_1$ $H_1: M_2>M_1$	$H_0: M_3=M_1$ $H_1: M_3>M_1$	$H_0: M_4=M_1$ $H_1: M_4>M_1$	$H_0: M_3=M_2$ $H_1: M_3>M_2$	$H_0: M_4=M_2$ $H_1: M_4>M_2$	$H_0: M_4=M_3$ $H_1: M_4>M_3$
$H=18,608$	$W_a = 43,5$	$W_a = 57$	$W_a = 57$	$W_a = 57$	$W_a = 57$	$W_a = 31$
$H_v=3, \alpha<7,815$	$28<W_a<50$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$W_a > 50$	$28<W_a<50$
+	-	+	+	+	+	-

"+" – постојање статистички значајне разлике

"-" – одсуство статистички значајне разлике

Израчуната вредност *Kruskal-Wallis-ove* статистике $H=18,608$ је већа од табличног прага значајности $H_v=7,815$ те уз ризик $\alpha=0,05$ прихвата се H_1 , да постоји статистички значајна разлика у степену заступљености везивног ткива за коју је одговорна нека од метода.

Израчунате статистике теста W_a при поређењу метода група III и IV са методом групе I као и при поређењу метода група III и IV са групом II веће су од горњег критичног прага (при одабраном нивоу ризика - *significant level* $\alpha=0,05$ и узорцима једнаке величине $n_1=n_2=6$), дакле уз наведени ризик α се одбацује H_0 о једнакости ефеката који се постижу применом ових метода у корист H_1 , односно методама група III и IV постижу се значајно бољи резултати него методом група I и II ($p<0.05$).

Поређењем метода група I и II као и метода група III и IV статистика теста W_a нашла се унутар интервала прагова значајности, стога се прихвата H_0 , да у овом експерименту не постоји статистички значајна разлика када се пореде ефекти ових метода ($p>0.05$).

Приликом поређења метода група III и IV сума рангова узорка групе III износила је $W_b=47$ (а горњи праг је 50) док је сума рангова узорка групе IV износила $W_a=31$, што нам говори да су методом групе III постигнати бољи ефекти, али не толико бољи да би се на датом нивоу поузданости (95%) исказала статистички значајна разлика ($p>0.05$) (Табела 4.65).

На основу сумираних резултата у временском интервалу од шест и осам недеља нису детектоване статистичке значајности разлика посматраног временског опсега, тако да се може закључити, да је период од шест недеља довољан за процес неурорегенерације, што потврђују резултати свих хистолошких параметара.

Анализа броја Шванових ћелија на хистолошким препаратима приказана је помоћу три технике бојења утврђеним методама (*luxol fast blue*, *Masson-Goldner*, *hematoxin-eosin*).

Шванове ћелије су на уздужним пресецима хистолошког препарата елонгиране (Слика 4.8. а) док на попречном пресеку имају овалан изглед (Слика 4.8. b,c) .

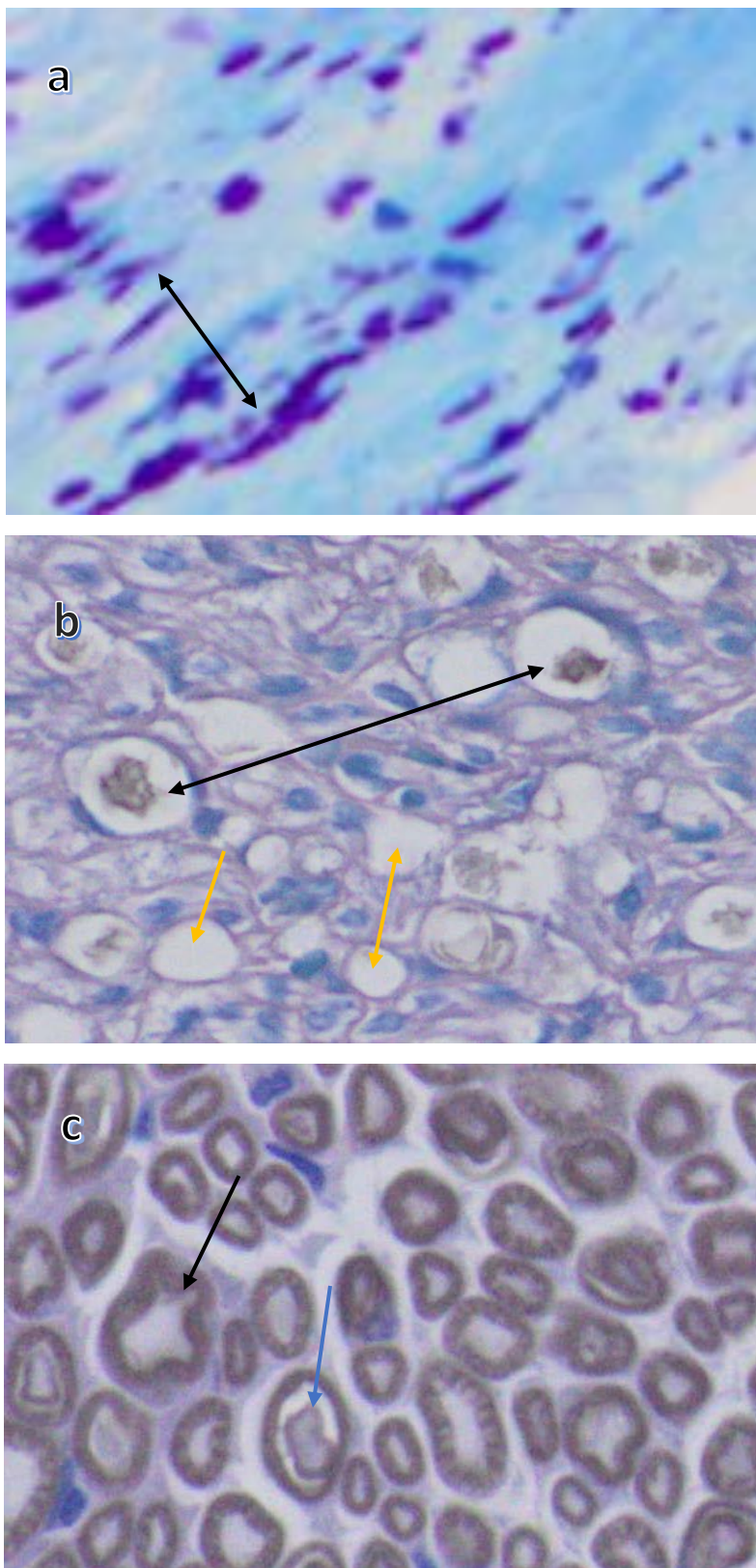
Приказане су Шванове ћелије на хистолошким препаратима пресека фацијалног нерва кунића контролне стране подгрупе „А“, где је нервно ткиво интактно (Слика 4.8. a,b,c).

На уздужном пресеку Шванове ћелије се запажају као вретенасте формације интензивно љубичасто пребојене са околним мијелизованим подручјем, које се боји катрактеристично тиркизноплавом бојом (*luxol fast blue*) по *Kluver-Barreri* (Слика 4.8. а-црна стрелица). Ова метода бојења је високо софистицирана у односу на мијелин.

На попречном пресеку *toludin-blue* бојењем нуклеус Шванових ћелија се приказује као овалана формација са дифузно распоређеним хетерохроматином. У цитоплазми се налази велики број митохондрија, рибозома, полирибозома, делова ендоплазматског ретикулума, као и Голџи апарат и појединачни лизозоми (Слика 4.8. b-црна стрелица).

На попречном пресеку *toludin-blue* бојењем Шванове ћелије се запажају као овална подручја са јако испупченим делом коме у нивоу једра. У појединим деловима корена овај облик је мало измењен појавом благих ундулација омотача (Слика 4.8 c - црна стрелица) .

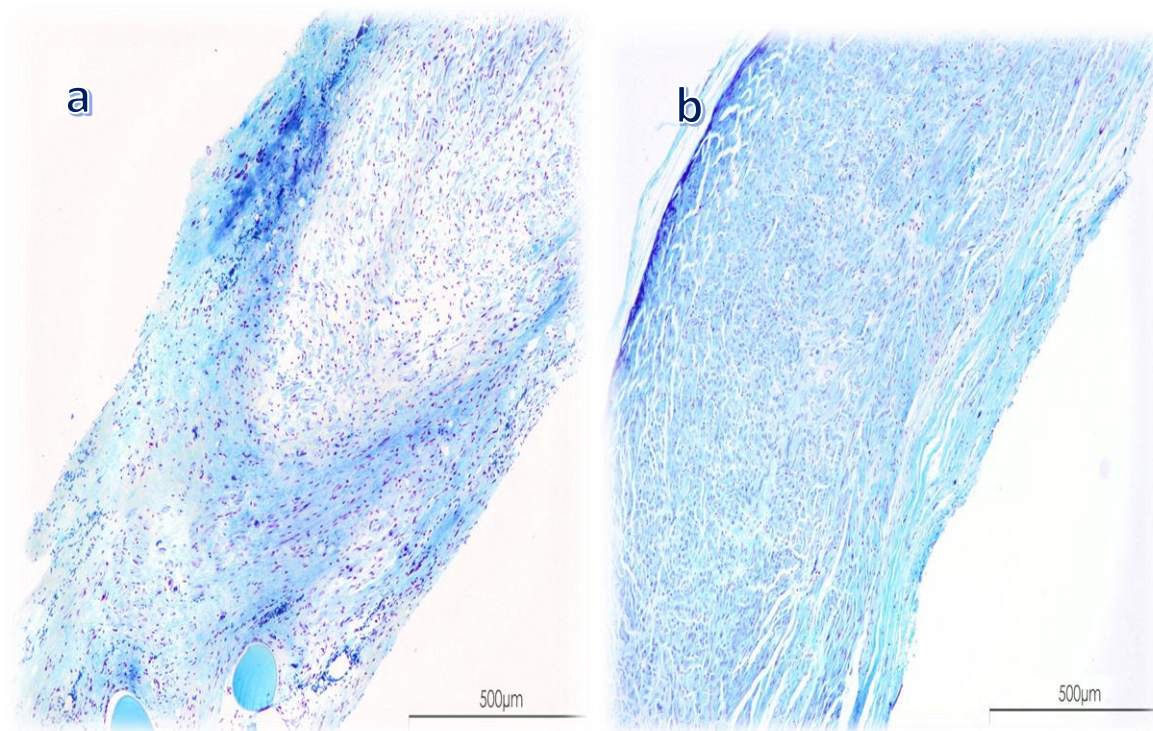
Шванова ћелија формира само један мијелински омотач. Уколико је омотач малих димензија он се практично налази у самој цитоплазми ћелије (Слика 4.8. c - плава стрелица). Што се тиче амијелинских аксона они су увек ван тела Шванове ћелије (Слика 4.8. b - жута стрелица).



Слика 4.8. Шванове ћелије контролна страна подгрупа „А“ (*luxol fast blue*) уздужни пресек (*longitudinal-section*) – a; (*toluidin-blue*) попречни пресек (*cross-section*) - b,c

На приказаном уздужном пресеку препарата групе I (подгрупе „A“) *luxol fast blue* бојењем по *Kluver-Barreri*, које показује посебан афинитет према мијелину (Слика 4.9. а), запажа се бело немијелинизовано подручје са оскудним Швановим ћелијама, које су приказане љубичастим једрима. Околина Шванових ћелија показује доста везивног ткива са потпуним одсуством аксона. Периферно од описане зоне уочава се карактеристично оскудно мијелинизовано плаво подручје, што сугерише на успорен процес регенерације нерва, дакле наведена метода реконструкције сутуром није дала задовољавајуће резултате.

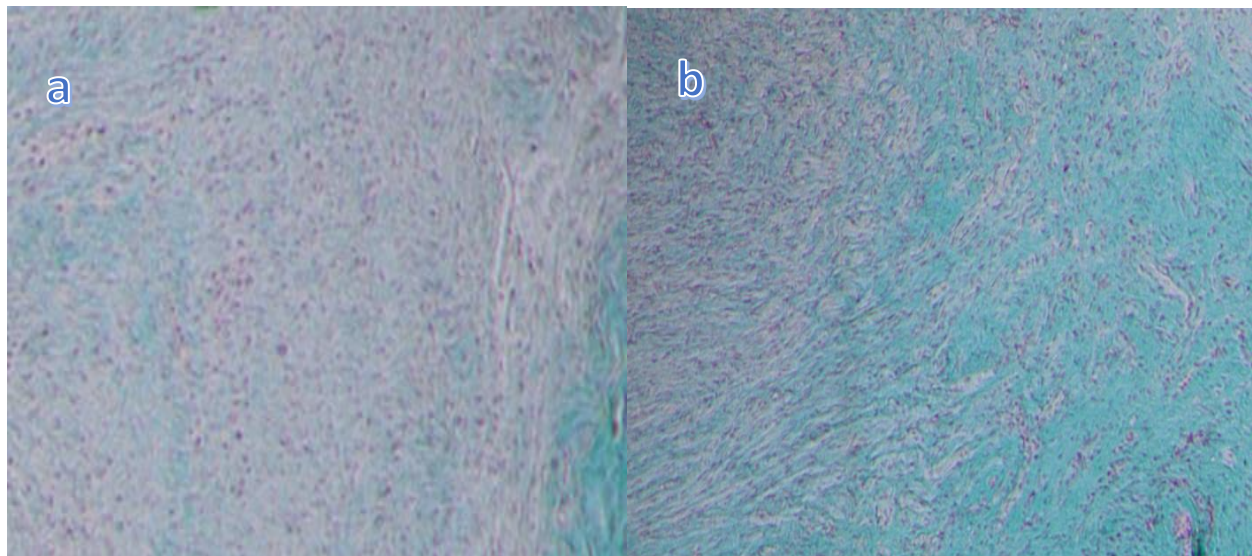
На уздужном пресеку нерва бојењем *luxol fast blue* групе III подгрупе „A“ (Слика 4.9. б) једра Шванових ћелија презентују се као љубичасте тачкасте формације између којих се налазе мијелинска поља пребојена карактеристичном тиркизноплавом бојом, што указује на формирање великог броја аксона. Немијелинизована подручја представљена белом бојом су јако редукована и више померена ка перинеуријуму. Између ламела слабо мијелинизованог подручја уочаваје се тракасто распоређено везивно ткиво где се очекује и већи број инфламаторних ћелија.



Сика. 4.9. Приказ Шванових ћелија група I (а) и III (б) (*luxol fast blue*) уздужни пресек (*longitudinal-section*) експериментална страна подгрупа „A“

На хистолошком препарату дела реконструисаног нерва II групе (подгрупе „Б“) где је примењено бојење по *Masson-u* након анализирања препарата уочавају се Шванове ћелије (једра на препарату означена пурпурно-црвеном бојом) у траговима са великим бледозеленим немијелизованим подручјем и доста колагених влакана. Одсуство мијелина је сигуран показатељ слабе неурорегенерације (Слика 4.10. а).

Код групе III подгрупе „Б“ на уздужном пресеку нерва бојењем *Masson-Goldnerovo* светлозеленим уочава се велики број пурпурно-црвених једара Шванових ћелија, које су инкорпориране у велике мијелинске плаже приказане карактеристичном тиркизнозеленом бојом. Између развијене мијелинске формације могу се наћи дискретне траке фиброзног ткива. Разлика у интерпретацији параметара неурорегенерације указује на висок степен опоравка нервног ткива код групе III (Слика 4.10.б).



Слика 4.10. Приказ Шванових ћелија група II (а) и III (б) (*Masson - Goldnerovo* светлозелено) уздужни пресек (*longitudinal-section*)

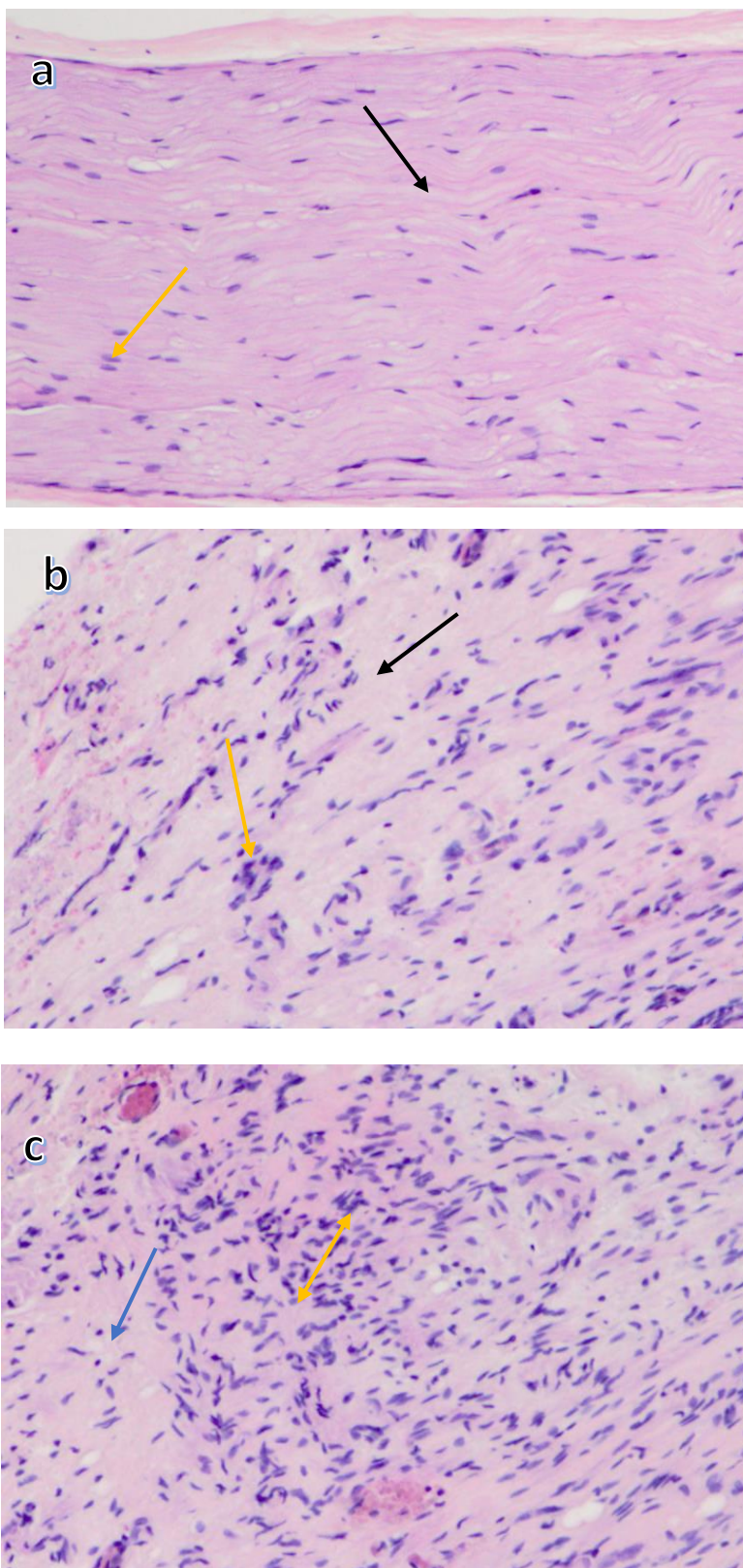
Методом бојења хематоксин-еозином приказане су хистолошке разлике између група I, II и III на уздужном пресеку дела фацијалног нерва при увећању од 400х.

На приказаном препарату групе I методом бојења *hematoxin-eosin* (Слика 4.11.a) при увећању од 400 х, приметно је јако наглашено везивно ткиво уз дискретно заступљене Шванове ћелије, које се приказују као тамнољубичаста ограничена подручја која окружују аксоне (жута стрелица). Између наглашеног везивног ткива у траговима се презентују ламеларно раслојена бледо-роза поља мијелина (црна стрелица). Сви параметри указују на јако успорен процес неурорегенерације.

На другом делу слике (Слика 4.11.b) групе II уочава се велика количина везивног ткива (црна стрелица) ламеларно распоређеног између мањих групица тамнољубичасто обојених Шванових ћелија (жута стрелица) уз дискретно присуство неправилних новоформираних крвних судова. Показатељи неурорегенерације су оскудни, али нешто бољи у односу на претходну слику.

Трећи део слике (Слика 4.11.c) препарата указује на присуство већег броја груписаних Шванових ћелија (црна стрелица) са видљивим пољима мијелина, што сугерише на појачано формирање аксона између којих је оскудно заступљено везивно ткиво са израженом мрежом новоформираних крвних судова (плава стрелица). Мијелинизација је показатељ успешне неурорегенерације. Шванове ћелије учествују у формирању мијелинског омотача који повећава брзину провођења акционог потенцијала дуж аксона, стога је њихова улога у процесу неурорегенерације неприкосновена.

Поређењем препарата I, II и III групе да се приметити знатна разлика у процесу регенерације нервног ткива када је реч о броју Шванових ћелија, а самим тим и степену мијелинизације, дакле доминантно су назначени показатељи успешне регенерације код групе III (Слика 4.11.c), што је и поткрепљено статистичком обрадом добијених резултата (Графикон 4.18).

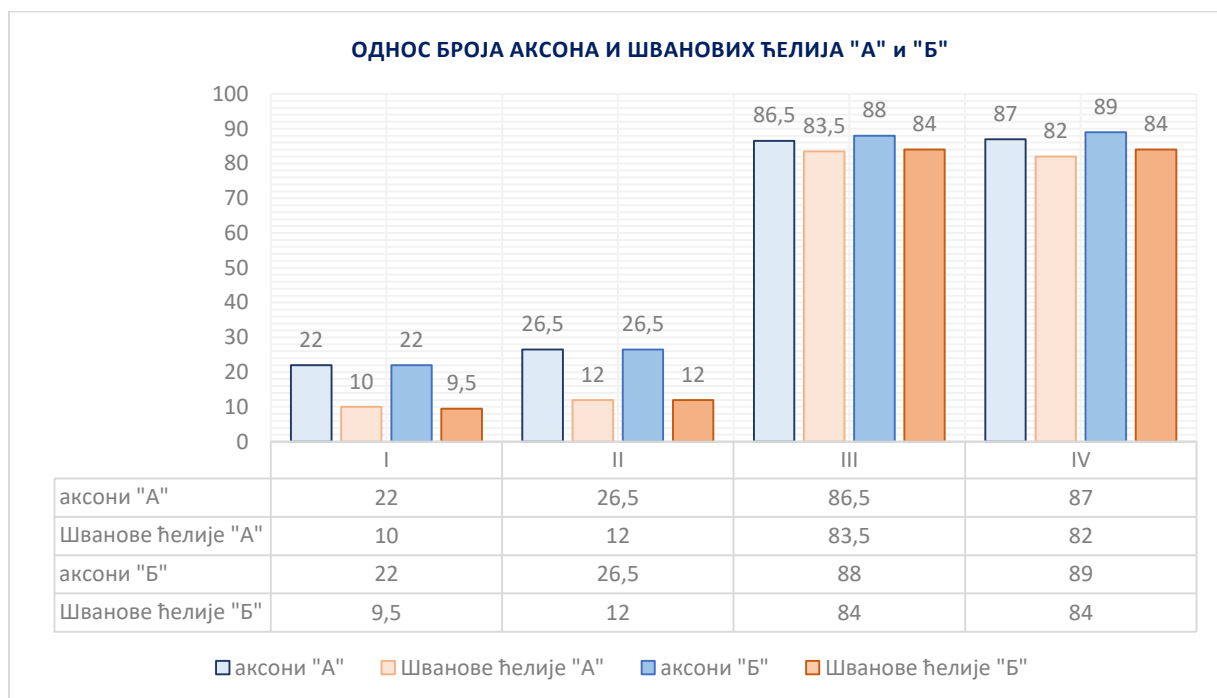


Сл 4.11. Приказ Шванових ћелија група I (a), II (b) и III (c) подгрупе „А“ уздужни пресек фасцикулуса (*longitudinal-section - hematoxin-eosin*)

4.4. КОРЕЛАЦИЈА БРОЈА АКСОНА И ШВАНОВИХ ЋЕЛИЈА

Однос аксона и Шванових ћелија је 1:1 за мијелизоване аксоне. Код немијелинизованих аксона, група од 8-15 аксона омотана је једном Швановом ћелијом, односно њеним дупликатурама. У зрелом нервном ткиву распоређене су у ланцу дуж аксона. Свака Шванова ћелија мијелинизује између 0,15 и 1,5 *mm* аксона.

Скор вредности броја новостворених аксона (Графикон 4.13) упоредили смо са скором вредности броја Шванових ћелија (Графикон 4.18) свих група обе подгрупе, а добијене резултате приказали графички (Графикон 4.19).



Графикон 4.19. Однос броја аксона и Шванових ћелија подгрупе „А“ и „Б“

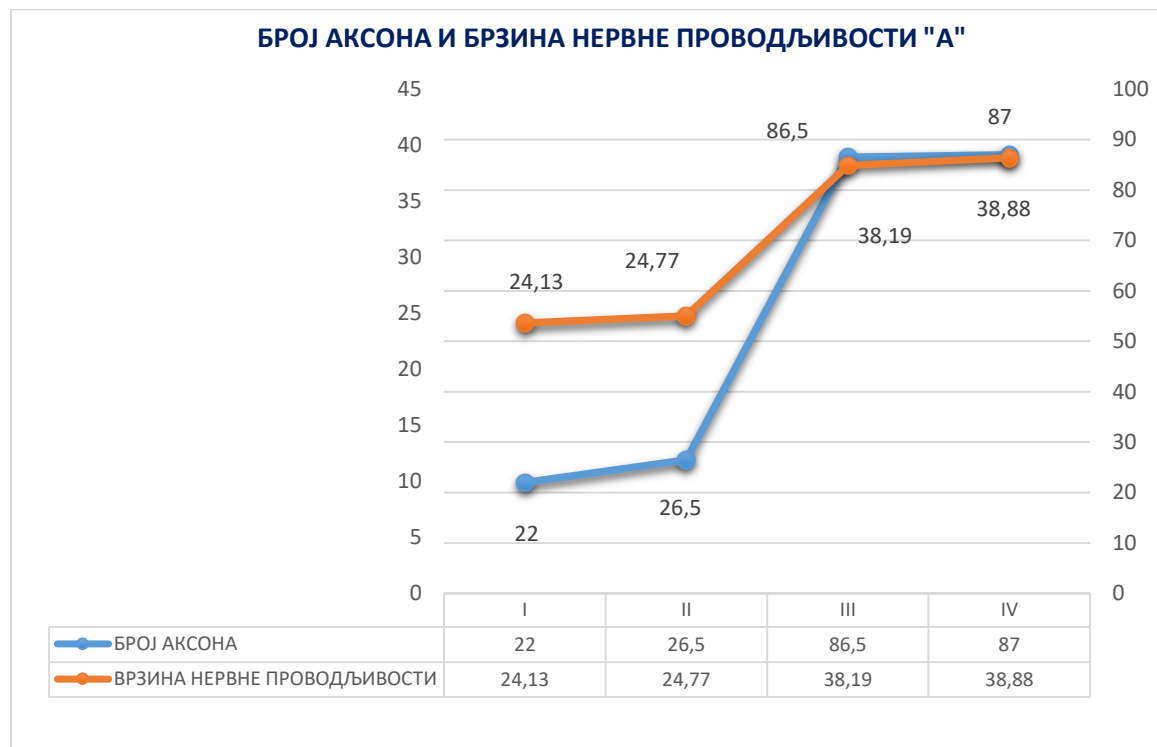
Може се запазити да код група I и II обе подгрупе („А“ и „Б“) број новостворених аксона је двоструко већи од броја Шванових ћелија, што иде у прилог наведеној тврдњи да једна Шванова ћелија обмотава 8-15 аксона код успорене мијелинизације односно компромитване и успорене регенерације нерва.

Код група III и IV тај однос је посве другачији, односно једна Шванова ћелија одговара једном аксону, мијелинизација је комплетна, а самим тим и регенерација нерва.

Број новостворених аксона је у корелацији са бројем Шванових ћелија код мијелинизованих аксона, односно здравог нерва. Самим тим се да закључити, да је процес неурорегенерације код група III и IV обе подгрупе комплетан. И овде је очигледно да је шест недеља (подгрупа „А“) временски интервал довољан за процес регенерације нерва.

4.5. КОРЕЛАЦИЈА БРЗИНЕ НЕРВНЕ ПРОВОДЉИВОСТИ И БРОЈА АКСОНА

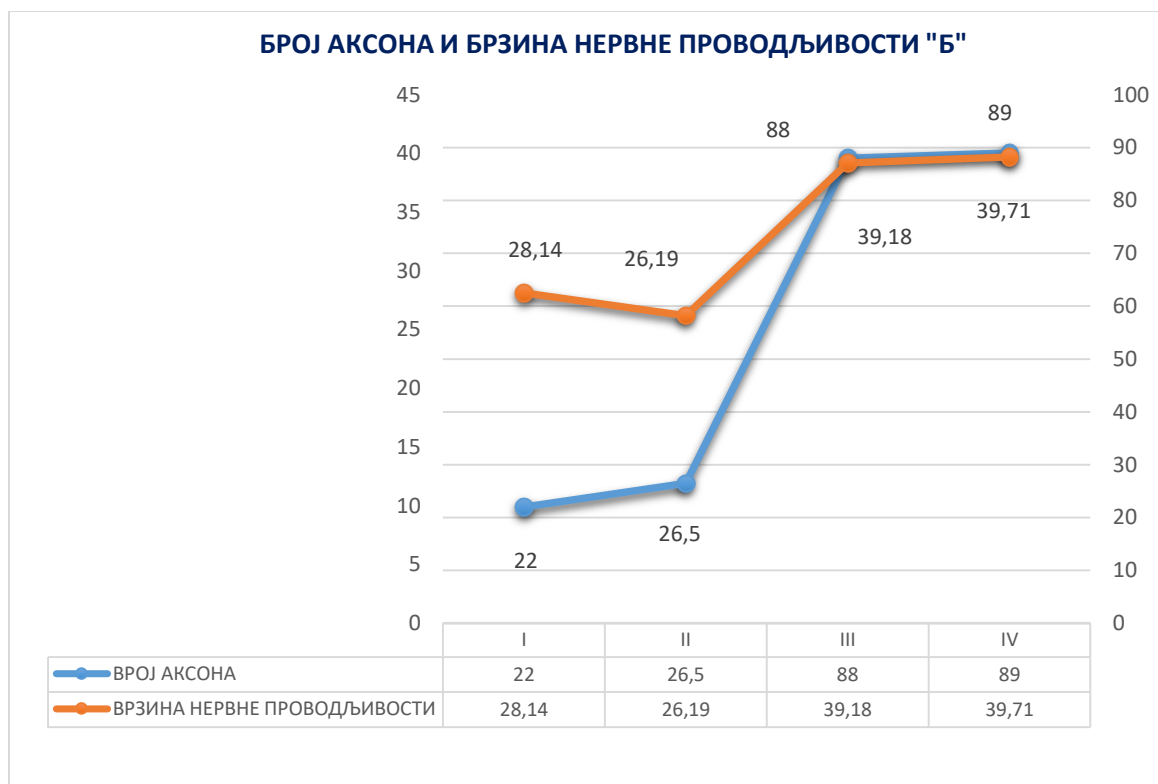
Одређивањем средњих вредности броја новостворених аксона и брзине нервне проводљивости на нивоу свих група, обе подгрупе, анализирани су односи наведених параметара посматрања. Добијени резултати су приказани графички (Графикони 4.20, 4.21).



Графикон 4.20. Однос броја новостворених аксона и брзине нервне проводљивости у подгрупи "А" (медијане).

Коефицијент корелације¹ брзине нервне проводљивости и броја аксона подгрупе „А“ износи 0,999 и представља изражену позитивну повезаност, односно налази се у распону савршене директне корелације (0,9-1). На приказаном графикону уочено је, да је раст броја аксона снажно пропраћен порастом брзине нервне проводљивости. Параметри посматрања који осликавају успешност неурорегенерације највеће вредности постижу у оквиру група III и IV.

¹ У статистичкој литератури не постоји потпуно слагање приликом тумачења појединих могућих вредности коефицијента просте линеарне корелације. Ипак, према Жижић, М. и сар. (2004), може се препоручити следећа груба скала за тумачење вредности r : $\pm 0,7$ корелација није изражена; од $\pm 0,7$ - $\pm 0,8$ постоји изражена директна-инверзна корелација; од $\pm 0,8$ - $\pm 0,9$ висока директна-инверзна корелација и од $\pm 0,9$ - ± 1 савршена директна-инверзна. Коефицијент корелације израчунат функцијом CORREL из Microsoft Office Excel 2007



Графикон 4.21. Однос броја новостворених аксона и брзине нервне проводљивости у подгрупи "Б" (медијане).

Однос броја аксона и брзине нервне проводљивости подгрупе „Б“ изражен је коефицијентом корелације који износи 0,986 и представља изражену позитивну повезаност, односно налази се у распону савршене директне корелације (0,9-1). Овде је раст броја аксона, такође снажно праћен порастом брзине нервне проводљивости.

На основу добијених резултата код обе подгрупе нема значајних статистичких одступања посматраних параметара између подгрупе „А“ и „Б“, стога се посматрани временски опсег у оквиру подгрупе „А“ може сматрати довољним за успешност неурорегенерације.

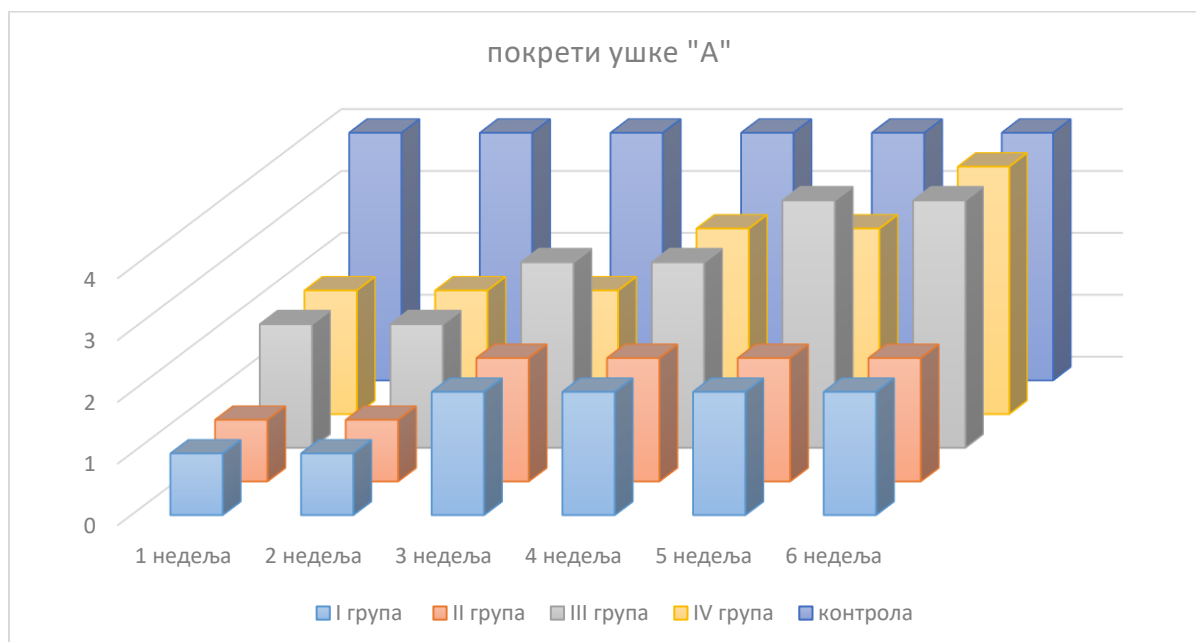
Анализирањем средњих вредности свих резултата добијених електрофизиолошким (брзина нервне проводљивости) и хистолошким претрагама (број аксона) запажа се реципроцитетна повезаност броја новостворених аксона и брзине нервне проводљивости, што је и био круцијални доказ успешности примене PRP-а у процесу неурорегенерације повређеног фацијалног нерва на експерименталном нивоу.

4.6. МЕТОДА СУБЈЕКТИВНЕ ВИЗУАЛИЗАЦИЈЕ ПОКРЕТА УШКЕ

У току трајања експеримента, једном недељно, методом опсервације грубог опоравка проверавана је покретљивост ушке са експерименталне стране у односу на покретљивост контролне стране код свих група, а на основу скалирања у пет тачака сумирани су добијени резултати.

Методом субјективне визуализације пратили су се покрети ушке у временски задатом интервалу од 6. и 8. недеља, једном недељно у односу на контролну страну.

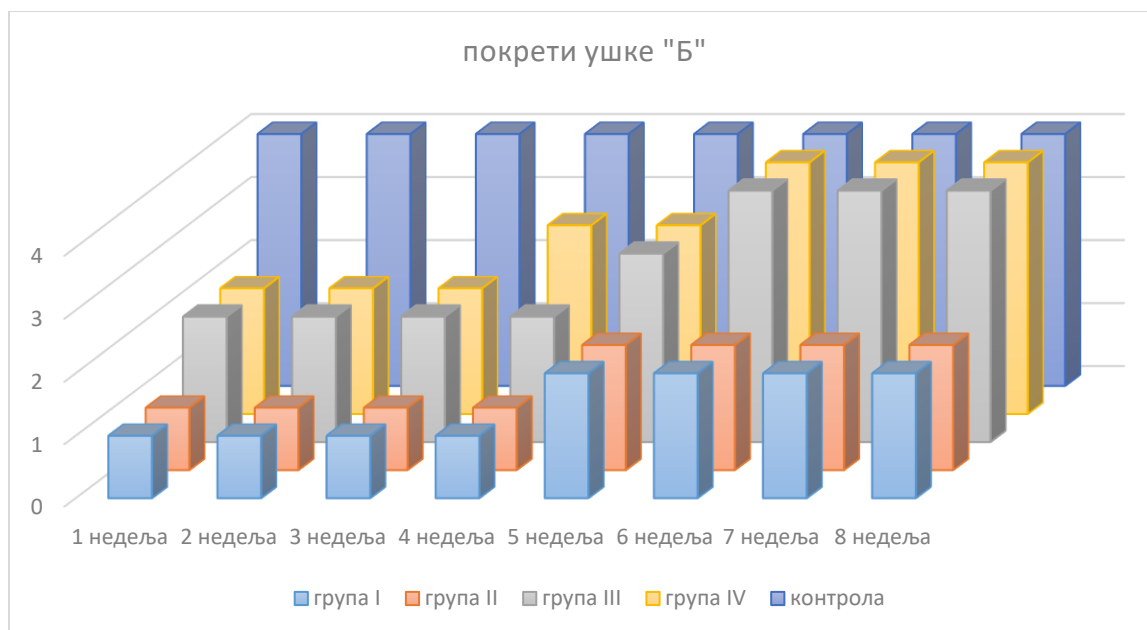
Резултати покрета ушке експерименталне (леве) стране су изражени на бројчаној скали од 0 до 4 (видети методологију) у односу на контролну (десну) страну код подгрупа „А“ и „Б“ (Графикони 4.22; 4.23).



Графикон 4.22. покрети ушке подгрупа „А“

0 = нема покрета, 1 = слабо детектабилни покрети, 2 = мање значајни покрети,
3 = већи асиметрични покрети, до 4 = симетрични покрети

Анализирајући резултате добијене методом субјективне визуализације закључено је да се код група III и IV почетком четврте недеље покрети ушке експерименталне (леве) стране приближавају онима са контролне (десне) стране, да би се покрети обе стране у шестој недељи изједначили (Графикон 4.22)



Графикон 4.23. покрети ушке – подгрупа „Б“

0 = нема покрета, 1 = слабо детектабилни покрети, 2 = мање значајни покрети,
3 = већи асиметрични покрети, до 4 = симетрични покрети

Након осам недеља (подгрупа „Б“) добијени резултати приближни су као и код подгрупе „А“, стога је закључено, да у периоду од шесте до осме недеље нема разлике у покретима ушке (Графикон 4.23). Шест недеља је довољан период за опоравак нерва применом PRP на основу наведеног параметра посматрања. Покрети ушке су у корелацији са бројем новостворених аксона и брзином нервне проводљивости.

Параметри неопходни за процену нервне регенерације по групама потврђују успешност примене PRP у III и IV групи без временске зависности. Како је методом примењеном код IV групе у комбинацији са PRP употребљен и FG упоређивани су резултате групе IV са II групом где је FG коришћен са сугуром. Резултати добијени на основу свих тражених параметара (електрофизиолошка, хистолошка и објективна визуализација) у II групи показују неадекватан неурорегенеративни одговор. Да се закључити, да је у процесу регенерације фацијалног нерва примена FG несврсисходна те је метода примене PRP далеко супериорнија и као таква прихватљива, што додатно промовише ефикасност методе примењене у оквиру III експерименталне групе, а као такве је издваја из остале три групе. Временска зависност опоравка нерва на основу свих параметара посматрања промовише подгрупу „А“, зато се може прихватити, да је шест недеља након индуковане повреде фацијалног нерва довољан период за неурорегенерацију.

5. ДИСКУСИЈА

Проучавање биолошких механизма и њихово разумевање на моделу експерименталних животиња од суштинске је важности јер води ка потенцијалној даљој клиничкој примени на људима. Фацијални нерв је најдужи периферни нерв у људском телу, обзиром да инервише мимичне мишиће лица, свака његова повреда носи сукцесиван низ последица и нарушавање здравља. У клиничкој пракси повреде периферних нерва су честа стања, а најчешће су окарактерисана трајним сензорним оштећењем и тешком моторном дисфункцијом.

Дуг период денервације може водити ка атрофији мишића, а самим тим и ка нарушавању квалитета живота. Статистички гледано, на годишњем нивоу број повреда периферних нерава узрокованих разним врстама трауматизама износи више од 200.000 повређених у Сједињеним Државама и 300.000 повређених у Европи (70).

И поред значајног потенцијала регенерације која имају периферна нервна влакна након повреде још увек исход опоравка није на задовољавајућем нивоу, зато што постоји слаб моторички опоравак и иреверзибилна сензорна дисфункција. Регенерација повређених нерава захтева сложени ћелијски и молекуларни одговор са циљем обнављања функције аксона, како би се повезали са ефекторима циљаних мишића. За сада најбољи терапијски протокол обнављања континуитета нерва је микрохируршка неуросутира или аутологна трансплантација нерва. Ове методе не доносе у потпуности опоравак нерва и имају велики број ограничења, посебно методе трансплантације због чега је сам процес нервне регенерације у фокусу константног интензивног истраживања (70).

До данас није усаглашена оптимизована терапија за потпуни опоравак након повреде периферних нерава. Суплементација факторима раста из PRP је новија и свестранија терапијска процедура за промовисање регенерације нерава и функционалног опоравка мишића. Показано је, да фактори раста активирају различите механизме сигналних каскада дисталног сегмента нерва у циљу обнављања аксона и њиховог повезивања са одговарајућим рецепторима у мишићима, чиме остварују своје вишеструке ефекте у процесу неурорегенерације (70).

Модел фацијалног нерва је претходних деценија омогућио прикупљање великог броја података о ћелијским и молекуларним одговорима мотоневрона и њиховог окружења на различите инсулте. За период од 2010. до 2022. године у литератури је присутно 46. радова из базе података који су се бавили проблематиком регенерације фацијалног нерва, при чему су крупне животиње (пси, овце и мајмуни) биле експериментални модел у случајевима реконструкције нерва методом трансплантације, када се графт користио изоловано или у комбинацији са биоматеријалима (60).

У већини истраживања је био примењен експериментални модел пацова, што се може објаснити релативно нижом ценом набавке ових животиња и лакшим условима одржавања истих.

Међутим, због развијености жвакаће мускулатуре кунићи представљају идеалан анимални модел за симулацију парализе фацијалног нерва, а затим и динамичког посматрања фаза регенерације. Предност овог експерименталног модела, када је у питању истраживање фацијалног нерва је то, што је код кунића пар недеља након повреде нерва изражена хемолиза и комплетна ремисија парализе (63). Оно што додатно доприноси анатомија фацијалног нерва кунића умногоме подсећа на људску, где јака жвакаћа мускулатура омогућава прецизно одређивање електромиографских параметара након симулације парализе, што их препоручује као идеалне експерименталне моделе у циљу проучавања ефеката биоматеријала, а самим тим и фактора раста на процес регенерације (60).

Отуда и идеја за ово истраживање, које је имало за циљ расветљавање потенцијалног терапијског деловања активираних фактора раста апликацијом плазме богате тромбоцитима на експерименталном моделу регенерације повређеног фацијалног нерва кунића. Праћењем електрофизиолошких и патохистолошких анализа уз методу субјективне визуализације покрета добила се процена успешности реконструкције нерва. Овим истраживањем добијени су и подаци, који се односе на сврсисходност примене фактора раста у процесу нервне регенерације, што све доприноси перспективи у лечењу реконструкције нерва (58,63).

Резултати овог истраживања које је обухватало индуковану повреду фацијалног нерва на кунићима, као и временско и квалитативно праћење опоравка фацијалног нерва након примене различитих биоактивних материја су значајни, када је у питању функционални опоравак мимичне мускулатуре. Запажа се, да примењени фактори раста у процесу регенерације фацијалног нерва, који се ослобађају дегранулацијом α гранула тромбоцита из плазме обогаћене тромбоцитима на месту повређеног нерва у комбинацији са неуросутомом знатно скраћују време регенерације нерва и доводе до бржег опоравка мимичне мускулатуре лица (58).

Резултати једне од првих студија која се бавила моделом фацијалног нерва код кунића објављени су од стране *Cossta-e* и сарадника 2006. године. Након краш повреде фацијалног нерва на основу квалитативних и квантитативних анализа, броја мијелинизованих аксона закључили су, да дегенерација настаје у прве две недеље, затим започиње процес делимичне регенерације до четврте недеље, да би до шесте недеље регенерација била преко 90 процената (63).

На основу ових резултата је и направљена поставка за временске интервале праћења регенерације аксона, као и препоруке у циљу добијања што прецизнијих резултата коришћењем експерименталног модела кунића.

У нашем експерименту прва подгрупа кунића је жртвована шест недеља након трансекције фацијалног нерва и реконструкције неком од четири методе, на основу препорука које су дали *Cossta* и сарадници у својој студији о временској зависности регенерације аксона. Друга подгрупа кунића је жртвована после осам недеља у циљу додатног временског периода потребног за праћење наведених параметара регенерације (63).

У литератури постоји јако мали број студија у којима су рађени експерименти на анималним моделима, а који се односе на регенерацију повређеног фацијалног нерва применом PRP, а самим тим оскудни су подаци о препорученим дозама, начину припреме и потенцијалним механизмима дејства (60).

Познато је да применом PRP долази до ослобађања фактора који својим дејством промовишу процес неурорегенерације. Након активације тромбоцита, алфа грануле се стапају са ћелијском мембраном, изазивајући дегранулацију и ослобађање многобројних фактора раста: *PDGF, TGF- β 1, PDAF, IGF-1, PF-4, EGF, ECGF, VEGF, bFGF, HGF* (49).

Значајност у добијеним резултатима применом PRP може се објаснити дејством активне супстанце у примењеној аутологној PRP смеси која има висок ниво тромбоцита, фактора раста, леукоцита, фибрина и разних биоактивних фактора, укључујући фибронектин, остеонектин и витронектин. Ове компоненте су значајне и неопходне за регенерацију ткива. У овој смеси постоји и висок ниво белих крвних зрнаца (неутрофили, моноцити, лимфоцити), који фагоцитирају инвазивне патогене и страна тела. Фибрин у PRP-у формира тродимензионалну мрежну структуру након активације и агрегације тромбоцита, пружајући основ за почетак регенерације ткива (50).

Потенцијал у примени PRP-а у процесу нервне регенерације манифестује се кроз неуропротекцију и превенцију неуронске апоптозе, стимулацијом *VEGF*, промоцијом регенерације аксона кроз регулацију инфламаторног одговора у микроокружењу и кроз ублажавање колатералне мишићне атрофије (72).

Временски интервал у коме PRP делује на неурорегенерацију зависи од процеса Валеријанове дегенерације. Валеријанова дегенерација настаје након повреде периферног нерва, што укључује дезинтеграцију аксона и демиелинизацију нерва у дисталном сегменту повређеног нерва. Остаци нервног ткива подлежу процесу фагоцитозе од стране макрофага регрутованих из периферне крви или нервног ткива, што може да обезбеди погодно окружење за почетак регенерације нерва. Моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (*monocyte chemoattractant protein-1* MCP-1) који луче Шванове ћелије подстиче активацију макрофага (50).

Познато је да макрофаги играју вишеструке улоге у процесу регенерације периферних нерава. Када макрофаги инфилтришу повређене нерве, они позитивно утичу на деструкцију и уклањање мијелина кроз опсонин зависне и опсонин независне механизме. Штавише, овај временски ток уклањања остатака мијелина се очигледно примећује почевши од 1. до 4. дана, са врхунцем на 7. дану и траје 14. дана након повреде. Поред мијелинске фагоцитозе, макрофаги такође луче више цитокина и хемокина. Неки од њих, као што су фактор раста, интерлеукин-1 и аполипопротеин Е, олакшавају опстанак Шванових ћелија и неурона, подстичу елонгацију аксона и реконструкцију периферних нерава, покрећући антиинфламаторни одговор. Услед прекомерне или продужене проинфламаторне реакције долази до превелике акумулације молекула одговорних за формирање ожиљака као, протеогликан хондроитин (*chondroitin sulfate proteoglycans –CSPG*) који ометају елонгацију аксона и израстање неурита (70). У каснијој фази након повреде прелазак макрофага са проинфламаторног на антиинфламаторни фенотип је од суштинског значаја за регенерацију аксона и ремиелинизацију нерва (70).

PRP има позитиван ефекат на активацију и поларизацију макрофага. Након Валеријанове дегенерације почиње процес регенерације нервног ткива. *VEGF*-а, који ослобађају Шванове ћелије и активирани макрофаги играју значајну улогу у процесу неоваскуларизације, односно формирања мреже крвних судова, који снабдевају кисеоником и хранљивим материјама дистални део повређеног нерва. Истовремено, интактне Шванове ћелије луче *NGF*, *BDNF* и *GDNF*, који стимулишу пролиферацију Шванових ћелија и формирање „Бингерових трака“ (*Büngner band*) (71).

NGF значајно смањује време потребно за поновни раст и ремиелинизацију аксона након повреде периферних нерава убрзавајући колапс дегенеративних нерава и уклањање мијелинских остатака. Ефекти *NGF* су посредовани $p75^{NTR}/AMP$ активираним протеин киназом (*AMPK*) ($p75^{NTR}/AMP$ -activated protein kinase), што резултира појачаним аутофагним активностима у Швановим ћелијама. Хистолошке студије су потврдиле, да *NGF* повећава пречник и број мијелизованих нервних влакана (70).

Како се формирају нови крвни судови Шванове ћелије мигрирају дуж новоформиране васкуларне мреже, која такође има водећу улогу у регенерацији аксона. Фактори раста из PRP-а ефикасно промовишу биолошку активност Шванових ћелија, као што су миграција, секреција *NGF*-а и пролиферација. Поред тога, висока концентрација *VEGF*-а у PRP-у може побољшати реоваскуларизацију (50).

С обзиром, да опстанак неурона, прорастање аксона и формирање синапсе у регенерацији нерва захтева комбиновано дејство више унутрашњих и спољашњих фактора, фокусирање на корелативне факторе укључене у регенерацију нерва је то што нас може довести до проналажења адекватне терапијске стратегије за лечење повреде периферних нерава (69). Регенерација периферних нерава након повреде индукована је ослобађањем трофичних фактора, који стимулишу прорастање аксона и повећано преживљавање неурона. Ендогено лучење фактора раста утиче на неурорегенерацију, али не у довољној мери да би подржали процес регенерације аксона и ремиелинизације у решавању дисфункције повређених периферних нерава. Да би егзогена примена веће концентрације фактора раста могла да реши постојећи проблем указали су многи научници, који су покушавали да дођу до оптималне концентрације тромбоцита као резервоара фактора раста у PRP-у, који индукују неурорегенерацију активирањем Шванових ћелија (70).

Zhu и сарадници су на *in vitro* спроведеном експерименту доказали, да је оптимална концентрација тромбоцита у PRP-у четири и по пута већа него у пуној крви. На основу стимулације пролиферације Шванових ћелија сугерисали су, да је праг концентрације тромбоцита у PRP-у < 450 процената и да све вредности изнад наведеног прага доводе до инхибиције пролиферације Шванових ћелија, односно имају супротан ефекат (73).

У нашем раду број тромбоцита из периферне крви кунића износио је $593.780 \pm 116.349 \times 10^3$ / μ л док у плазми богатој тромбоцитима тај број износи од $2.567.523 \pm 1.126.519 \times 10^3$ / μ л, што значи да је концентрација тромбоцита у PRP-у четири пута већа него у пуној крви (Графикон 4.1).

На основу претходних изнетих података из литературе концентрација тромбоцита добијена у нашој студији представља оптималну дозу за процес неурорегенерације, што указује да су наши резултати у складу са вредностима досадашњих испитивања.

Један од првих радова у коме се испитује изоловано дејство PRP на процес регенерације након трансекције фацијалног нерва публикован је од стране *Farrag-a* и сарадника. Они су код 49. пацова подељених у четири групе након индуковане секције стабла фацијалног нерва применили различите реконструктивне методе (сутура, FG, PPP и PRP) са посебним акцентом на групу код које је употребљен PRP (66). По истеку осме недеље експеримента животиње су подвргнуте квалитативним и квантитативним методама испитивања, које укључују електрофизиолошка, хистолошка и методе субјективне визуализације покрета. Електрофизиолошким испитивањима одређена је латенца, амплитуда и брзина нервне проводљивости док се хистолошка верификација односила на одређивања броја и пречника новостворених аксона. У току трајања експеримента на основу посебно формиране скале чији је *Farrag* (66) творац, са вредностима од 0 до 4 одређиван је степен покрета бркова у оквиру методе визуализације покрета.

Електрофизиолошким испитивањима на основу упоређивања вредности латенце експерименталне стране пре и након реконструкције код групе где је употребљен PRP износиле су 0,6 ms, а код групе са FG 1,2 ms. Вредности амплитуде код групе са PRP износиле су 3,8 μV , а код групе са FG 4,0 μV . Резултати упоређивања између група указују на најбоље перформансе код групе где је употребљен PRP у комбинацији са сутуром. Хистолошки параметри који се односе на број новостворених аксона код групе са PRP износе 19.312 а код групе са FG 4.246 аксона. Закључак је, да је код групе са PRP готово четвороструки пораст броја аксона у односу на групу са FG (66).

Поређењем са резултатима нашег рада дошло се до сличности, али и разлика које су већином засноване на самом дизајну експеримента. У доступној литератури не постоје испитивања урађена на експерименталном моделу кунџа са оваквим дизајном студије.

У нашем експерименту, осам недеља након индуковане хируршке повреде фацијалног нерва кунџа и спроведених метода реконструкције резултати електромиографских испитивања су били приближни *Farrag-ovim* резултатима, с тим што смо ми користили другачија упоређивања експерименталне и контролне стране, а разлика у животињском моделу доводи до неподударања свих параметара. Коначни резултати су приближни и говоре у прилог успешности примене PRP.

Након поређења ефеката средњих вредности латенце и амплитуде осам недеља након репарације повређеног фацијалног нерва између експерименталне стране III групе ($L=1,59$ ms; $A=2,13\mu V$) (Табеле 4.13, 4.49) и експерименталне стране II групе ($L= 2,37$ ms, $A= 1,16\mu V$) (Табеле 4.12, 4.48), а са референтним вредностима контролне стране III групе ($L=1,57$ ms, $A= 2,54\mu V$) (Табеле 4.13, 4.49) и контролне стране II групе ($L=1,59$ ms, $A=2,55$ μV) (Табеле 4.12, 4.48), запазили смо разлику у корист III групе, односно резултати експерименталне стране наведене групе одговарају референтним вредностима контролне стране, што није случај са II групом (Графикони 4.5 , 4.9).

Метода субјективне визуализације рађена је по узору на *Farrag-ovi* скалу, с тим да смо посматрали покрете ушке, а не бркова (66). Посматрање покрета ушке у нашем раду је јединствено и није описано у нама доступној литератури. Код групе где смо употребили PRP након осам недеља дошло је до комплетне покретљивости ушке, што смо изразили бројчано оценом 4. на нумеричкој скали по наведеној методи (Графикон 4.23).

Када је реч о хиостолошким параметрима за разлику од Фарага у нашем испитивању је одређен и број Шванових ћелија, степен неоваскуларизације и степен присуства фиброзног ткива, односно приказали смо све елементе неопходне за комплетну регенерацију нерва. Хиостолошким претрагама доказано је повећање броја аксона код III групе где смо користили PRP, односно број аксона је био четири пута већи него код II групе где смо употребили FG (Графикон 4.13). У овом делу експеримента наши резултати се подударају са *Farrag-ovim*. Наведеним резултатима је потврђено да амплитуда и латенца одражавају степен мијелинизације повређеног фацијалног нерва, односно броја новостворених аксона.

Сврха студије коју су спровели *Cho* и сарадници је била, да се испитају ефекти плазме богате тромбоцитима и неурално индукованих хуманих мезенхималних матичних ћелија (mMSC) на регенерацију аксона након повреде фацијалног нерва на моделу заморца. Експеримент је укључивао трансекцију стабла фацијалног нерва код 24 заморца који су подељени у три групе. Четири и шест недеља након спроведене регенерације фацијалног нерва резултати су сумирани на основу електрофизиолошких и имунохистохемских анализа. Групе које су третиране PRP и PRP у комбинацији са mMSC показале су идентичне резултате. Ова студија указује, да не постоји бенефит примене изолованих mMSC у односу на PRP, што се може објаснити значајном улогом PRP у процесу активације матичних ћелија које су непостојане у функцији времена (67).

Још једна занимљива студија *Liheng Li* и сарадника је урађена на великој експерименталној групи од 100 пацова, када су процењени морфолошки и биолошки ефекти PRP-а на повреду фацијалног нерва. Методе евалуације четири недеље након спровођења експеримента укључивале су бихевиоралне анализе, (посматрање покрета бркова и блинк рефлекса) електрофизиолошка испитивања и имунохистохемске анализе (68). Тестови ланчане реакције полимеразе (*Polymerase Chain Reaction- PCR*) коришћени су за откривање експресије фактора раста у можданим једрима и аксонима. Резултати PCR теста су показали, да PRP ослобађа факторе раста, који укључују неуротрофни фактор раста *NGF* (*NGF-NT-4*) и неуротрофни фактор који потиче из мозга *BDNF*, односно повећава експресију неуротрофних фактора *BDNF* и *NT-4* у фрагментима фацијалног нерва док је смањена експресија истих у фацијалним једрима у мозгу (68).

Овај податак сугерише, да се неуротрофни фактори ослобађају из PRP, а не из једара у мозгу. Имунохистохемија је такође показала више нивое експресије протеина C-100 у PRP групи у поређењу са другим групама. Електрофизиолошка испитивања су показала, да у групи где је употребљен PRP у трећој недељи вредност амплитуде се драстично смањује ($1,30\mu V$) и приближава референтним вредностима ($1,85\mu V$) док је латенца пролонгирана код групе са PRP ($1,5\text{ m/s}$) и у компарацији је са контролном групом ($1,5\text{ m/s}$) (68).

Наведени параметри електрофизиолошких и хистолошких анализа су приближни резултатима нашег истраживања, где су вредности амплитуде у III групи након шест недеља износиле $2,13\mu V$ приближавајући се референтним вредностима $2,54\mu V$ (Табела 4.42, Графикон 4.8), а вредности латенце након шест недеља износиле су $1,61\text{ m/s}$ и у корелацији су са контролном групом (Табела 4.6, Графикон 4.3).

Треба напоменути, да су у нашем експерименту коришћени кунићи, тако да је због анатомскоморфолошких разлика немогуће направити идеална поређења већ се она заснивају на основу параметара добијених резултата.

Sahin са сарадницима је комбиновао примену кситозана као биолошког материјала, који је нашао употребу у имитацији нервних тубуса са PRP, а након компресије букалне гране фацијалног нерва код експерименталног модела миша. Три недеље након почетка експеримента на основу електрофизиолошких и хистолошких анализа запажају се најбољи резултати у смислу редукције дегенерације аксона у групи где се користио кситозан са PRP, број новостворених аксона у овој групи је три пута већи у односу на контролну групу (73). У нашем истраживању број новостворених аксона је нешто већи у групи где смо користили PRP у односу на претходни рад, али у приближном односу (Графикон 4.13). Како је у овом експерименту коришћен кситозан изоловано са знатно лошијим резултатима може се закључити, да су за процес неурорегенерације ипак заслужни фактори из PRP, а кситозански тубуси су корисни за правилно усмеравање аксона од проксималног ка дисталном сегменту нерва дајући стабилност и постојаност факторима раста у окружењу (73).

Познајући структуру PRP-а у току последње деценије све се више истраживања фокусира на значају изолованих појединих фактора раста у процесу неурорегенерације. Инсулину сличан фактор раста *IGF-1* је природно произведен пептид за који се показало, да се синтетише у мозгу и периферним нервима. Такође је утврђено, да је трофички фактор за различита ткива. *IGF-1* рецептори су приказани у нервним ткивима гмизаваца, водоземаца и сисара као што су пацови, зечеви и пилетина. *IGF-1* стимулише развој и раст неурона и глијалних ћелија. Штавише, показало се да *IGF-1* промовише раст неурита и преживљавање неурона.

Bayrak и сарадници су на моделу кунића испитивали ефикасност локално примењеног *IGF-1* на опоравак функција фацијалног нерва након повреде настале нагњечењем у екстракранијалном делу. Резултати ефикасности *IGF* су презентовани електромиографским испитивањима 10. и 42. дана након повреде, када су упоређене вредности амплитуде и латенце сложених мишићних акционих потенцијала фацијалних нерава и на експерименталној и здравој страни (69).

Вредности амплитуде 42. дана након спроведене реконструкције фацијалног нерва код групе где је примењен *IGF* су износиле $2,99\mu V$, што је приближно нашим резултатима вредности амплитуде код групе где је употребљен PRP ($A = 2,13\mu V$) (Табела 4.42, Графикон 4.8) шест недеља након хируршке интервенције, што би у процентима успешности износило 92,5% (Графикон 4.10).

Када упоређујемо резултате које осликавају вредности латенца примећујемо подударња у истом временском периоду, код *Bayraka* вредности латенце износиле су $1,40\text{ m/s}$ а у нашем раду код групе III где смо употребили PRP латенца је износила $1,61\text{ m/s}$ (Графикон 4.3). Хистолошким анализом након 6. недеља одређена је структура мијелинског омотача, статус Шванових ћелија, ангиогенеза, дебљина епинеуријума и присуство колагена.

Закључак аутора је да примена *IGF* на месту повреде фацијалног нерва указује на правилан распоред аксона, мијелинизација и пролиферација Шванових ћелија у оквиру референтних

вредности, епинеуријум је такође био нормалног хистолошког изгледа, а степен заступљености везивног ткива је био једва присутан.

Све је то потврдило ефикасност локално примењеног *IGF-1* на процес регенерације фацијалног нерва након повреде (69).

Слично овим истраживањима и *Sugiyama* и сарадници су испитивали ефикасност *IGF-1* у лечењу парализе фацијалног нерва на животињском моделу заморца. Опоравак парализе фацијалног нерва након компресије у темпоралном делу процењен је у 8. недељи експеримента на основу степена затварања капака у посебним коморама коришћењем ваздушног стимулуса са одговором снимљеним видео камером, електронеурографије (амплитуда и брзина нервне проводљивости) и хистолошки, одређивањем броја аксона (74). Електромиографским анализама утврђена је вредност амплитуде пре и након реконструкције повређеног фацијалног нерва код групе где је употребљен PRP (пре $A=2,50\mu V$, након $A=1,90\mu V$).

Вредности амплитуде наших резултата у истом временском периоду за експерименталну групу III где смо користили PRP износе (пре секције $A=2,54\mu V$, након реконструкције $A=2,13\mu V$) (Табела 4.49), односно то би процентуално изражено било 95% успешности регенерације нерва применом PRP (Табела 4.10). Када се упореде резултати вредности амплитуде наведеног рада и наши уочава се подударност, што упућује на ефикасност примене фактора раста у процесу неурорегенерације. Наведени аутори промовишу дејство *IGF-1*, што резултира значајним побољшањем у промени степена затварања капака експерименталних животиња током укупног временског периода до потпуног опоравка, који је у корелацији са вредностима амплитуде (74).

Независна друга студија је показала дејство *IGF-1* на експресију mRNA рецептора у фацијалном нерву до 14. дана након повреде (74).

Неколико студија је доказало да фактори раста могу индуковати неуронску диференцијацију мезенхималних матичних ћелија (MSC).

Најновији рад *Vierira* и сарадника указује на бенефит примене *IGF* у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама на моделу пацова. У периоду 3. месеца након почетка експеримента сумирани су резултати спонтане моторне активности фацијалног нерва праћењем покрета вибриса, рефлекса додир и отварања очију, као и имунохистохемиске анализе. Поред функционалне процене фацијалног нерва, имунохемиским анализама спроведено је и анализирање моторног једра фацијалног нерва у можданом стаблу, како би се проценио и утицај *IGF-1* и мезенхималних ћелија након инокулације на централном нивоу.

Екстратемпорална примена *IGF-1* и *MSC*-а резултирала је побољшањем степена затварања капака, рефлекса додир и покрета вибриса током целог периода истраживања. Постојао је значајно већи број ћелија у једру фацијалног нерва у групи третираној са *IGF-1* и *MSC*.

Повезаност између фактора раста и матичних ћелија потенцира морфофункционалну регенерацију фацијалног нерва, која се одвија брже и ефикасније (76).

Показало се да основни *FGF* важан фактор регенерације нерава има снажан ефекат на ангиогенезу *βFGF*, промовише пролиферацију Шванових ћелија, али је употреба екзогеног *βFGF* за *in vivo* регенерацију периферних нерава ограничена његовим кратким *in vivo*

полуживотом. Једна успешна стратегија за регенерацију периферних нерава састоји се у томе, да се изазове миграција довољног броја Шванових ћелија из оба сегмента нерва (75).

Matsumine са сарадницима је показао, да се *βFGF* континуирано ослобађа из микросфера желатинског хидрогела током прве друге недеље регенерације нерва код експерименталних пацова где је направљен дефект букалне гране фацијалног нерва дужине 7mm. Хистолошки преглед седам недеља након имплантације *FGF* открио је значајно повећану брзину регенерације нерава, индукцију већег броја регенерирајућих аксона и бољи степен сазревања аксона у експерименталној групи пацова где је дефект премошћен хидрогелом са додатим *FGF* у односу на контролну групу где је дефект само премошћен хидрогелом (54).

Још једна група истраживача, *Ma* са сарадницима је на моделу пацова дефект букалне гране фацијалног нерва дужине 8 mm премостио колагеном у комбинацији са *FGF* и неуралним матичним ћелијама NS/PC. Након трансплантације, искористивост матичних ћелија је ограничена јер се број живих ћелија брзо смањило због недовољних сигналних молекула, као што су фактори раста у микроокружењу, које окружује трансплантиране ћелије. У ту сврху је као активатор матичних ћелија употребљен *FGF*. Након 12. недеља од почетка експеримента на основу електрофизиолошких и хистолошких параметара показано је, да је за стабилност матичних ћелија неопходан хидрогел, али активација истих је несврсисходна без примене фактора раста у овом случају *FGF* (76).

Wang са сарадницима у својој студији на белим новозеландским зечевима је дефект фацијалног нерва реконструисао колагенским каналом (*collagen-binding domain CBD*), који је послужио као носач *FGF*. У периоду 15, 30. и 90. дана након повреде жртвована су по три зеца у свакој групи. Регенерација повређеног фацијалног нерва је процењена електрофизиолошким прегледом (сложени мишићни акциони потенцијали), скенирајућим електронским микроскопом и хистолошким посматрањем. Резултати су сугерисали да коришћење колагенских канала са рекомбинантним протеинима (*CBD*) у комбинацији са *βFGF* подстиче функционални опоравак фацијалног нерва уз напомену за неопходност додатног испитивање (53).

Barras са сарадницима је проучавао улогу глијалног неуротрофног фактора *GDNF* у регенерацији фацијалних нерва показујући, да је *GDNF* моћан неуротрофични фактор који побољшава регенерацију фацијалног нерва у периферном нервном систему и промовише преживљавање неурона у централном нервном систему.

У овој претклиничкој студији истраживачи су применили *GDNF* локално на дисталне шавове аутологних нервних трансплантата у мандибуларној грани фацијалног нерва и упоредили тренутну и седмомесечну одложену репарацију након трансекције нерва (77). Група код које је спроведена рана трансплантација уз примену *GDNF* показала је тенденцију ка лошијим резултатима, на супрот томе, код одложене трансплантације уз примену *GDNF*-а добили су се много бољи резултати.

Ово сугерише, да додавање егзогеног *GDNF*-а може инхибирати регенерацију нерва након ране трансплантације. Смањена регенерација добијена у случају ране трансплантације

нерва уз примену егзогеног *GDNF*-а може се приписати превеликој концентрацији овог неуротрофичног фактора, који у вишку може бити штетан за регенерацију нерва.

Међутим, у случају продужене денервације (групе са одложеном репарацијом од 7. месеци), егзогено снабдевање неуротрофичним супстанцама повећава активност Шванових ћелија чиме се побољшава регенерација периферних нерава у хронично денервисаном дисталном нервном сегменту.

Ова студија је показала, да *GDNF* омогућава повећање броја и сазревања нервних влакана као и броја ретроградно обележених неурона у одложеним анастомозама. *GDNF* је моћан неуротрофични фактор за побољшање регенерације фацијалног нерва у трансплантату, који се изводи неколико месеци након лезије нерва (77).

Повећана експресија *TGF-β* се такође примећује након повреде периферног нерва. Познано је да се фамилија *TGF-β* састоји од више изоформи са широким спектром биолошких активности. Чланови подфамилије *TGF-β* регулишу зарастање рана, инхибирају имуне одговоре, одржавају екстрацелуларни матрикс и регулишу раст и диференцијацију епителних и ендотелних ћелија, они такође регулишу ћелијску активност, раст, пролиферацију, апоптозу, диференцијацију, поларитет, миграцију, инвазију и адхезију, као и регенерацију нерва и промовишу формирање глијалних ожиљака (78).

Конкретно, *Wang* је истраживао улогу *TGF-β3* у регенерацији повређеног фацијалног нерва на експерименталном моделу показујући, да ова изоформа у великој мери повећава пречник и брзину проводљивости аксона у нервима и убрзава регенерацију и мијелинизацију нервних влакана, чиме се промовише репарација целог фацијалног нерва (78).

Liu је на експерименталном моделу 36. кунића дефект букалне гране фацијалног нерва дужине 10 mm премостио кситозанским тубусом у комбинацији са *NGF*. Након 3. месеца електромиографским мерењима и хистолошким анализама добио је задовољавајуће резултате у смислу броја аксона, дебљине мијелинског омотача без формирања неурона. Оно што је битно у овој студије јесте податак, да се током читавог трајања експеримента ослобађао *NGF* као главни неуропротективни фактор захваљујући присуству кситозанског тубуса ако се зна, да његово дејство траје између 3. и 7. недеља након имплантације продужетак дејства сигурно води ка бенефиту у процесу неурорегенерације (56).

Подаци из литературе су показали, да *Chao* и сарадници у експерименталној студији потенцирају дејство хидрогела (*chitosan-β-glycerophosphate*/GP) употребљеног као носача неуротрофног фактора раста (*NGF*) у комбинацији са венским графтом, код премештавања дефекта букалне гране фацијалног нерва промера 5mm на моделу пацова. Показало се, да је C/GP хидрогел идеално средство за континуирано ослобађање фактора раста у венском трансплантату, што потврђује хистолошка верификација регенерисаних аксона са дебљим мијелинским омотачем уз електромиографску потврду приближавања вредности акционог потенцијала мишића инервисаних фацијалним нервом са вредностима код очуваног нерва (79).

У нашој експерименталној студији коришћен је и FG у комбинацији са сутуром (II група) и плазмом богатом тромбоцитима у (IV група). Познато је, да у области хирургије периферних нерава употреба фибриноског лепка као алтернативе конвенционалној микрохируршкој неурорафији последње две деценије је предмет интензивног истраживања доминантно на експерименталним животињским моделима. Предности фибриноског лепка за реконструкцију нерва укључују техничку једноставност употребе, мање манипулације ткивом и краће време операције. Комбиновање фибриноског лепка са једним или два позициона шава омогућава прецизно поравнавање нервних влакана и чини се, да обезбеђује довољну снагу, да се спречи дехисценција (57).

Koortman 2022. године приказује велику мета-анализу која се бави употребом фибриноског лепка у процесу нервне регенерације у периоду до 2021. године. Од укупно 2.057 референци укључено је 37. студија на животињама, две кадаверичне и четири на људима. Фацијални нерв је био предмет изучавања у 8. од 37. студија на експерименталном животињском моделу (80).

Bento (1989) је први приказао улогу фибриноског лепка у процесу реконструкције повређеног фацијалног нерва након изласка из стиломасточног отвора, на експерименталном моделу мачке. Циљ његовог испитивања је био поређење фибриноског лепка као адхезива и стандардног епинеуралног шава методама електрофизиолошких и хистолошких процедура. Он је након завршетка експеримента дао предност примени фибриноског лепка у процесу неурорегенерације (81).

Пар година касније *Bento* (1993) спроводи студију на људима где је повреду фацијалног нерва насталу траумом у пределу темпоралне кости третирао трансплантатима и директном сутуром уз подршку FG. Као и код експерименталне студије и овде наводи позитивне ефекте FG на процес регенерације аксона фацијалног нерва и реинервације мимичних мишића лица (82).

Последње две деценије FG у процесу нервне регенерације не налази предност у односу на стандардну неуросутуру, што сугеришу и студије настале у том периоду.

Sanndrini 2007. године на моделу кунића испитује корелацију између брзине нервне проводљивости и броја новостворених аксона након трансекције фацијалног нерва кунића употребом FG (83).

Средња вредност нервне проводљивости здравог фацијалног нерва кунића износи између 41,1- 42,9 *m/sec* при температури од 25 °C (84).

У наведеној студији просечна брзина нервне проводљивости неповређеног нерва је износила 36.53 *m/sec*. Осам недеља након реконструкције FG проводљивост је износила 23,67, односно приближно 81% нормалне средње вредности. Новостворени аксони су се детектовали након четврте недеље експеримента (83).

У нашој студији брзина нервне проводљивости шест недеља након реконструкције повређеног фацијалног нерва сутуром (група I) износила је 24,13 *m/sec* (Табела 4.29), а

применом FG (група II) износила је 24,77 *m/sec* (Tabela 4.30), што је подударно са резултатима Сандринијеве студије.

Није било значајне корелације између брзине нервне проводљивости и броја новостворених аксона код ових група (Графикон 4.20), што сугерише, да FG није показао предност у односу на епинеуралну сутуру. Сандрини наводи, да FG даје већу стабилност нерву у процесу регенерације у односу на сутуру, ми те параметре нисмо приметили. Брзина нервне проводљивости код групе III где је употребљен PRP у реконструкцији повређеног нерва износила је 38,19 *m/sec* (Табела 4.31), дакле наведене вредности се крећу у оквиру референтних вредности (84).

У овом случају брзина нервне проводљивости је у корелацији са бројем новостворених аксона (Графикон 4.20.). Закључујемо, да FG нема неурорегенеративно дејство и тиме смо сагласни са резултатима претходне студије.

Кнох је 2013. године упоређивао утицај FG на процес нервне регенерације трансцираног фацијалног нерва миша у односу на неуросутуру водећи се вредностима параметара електромиографије. Након три недеље није приметио значајне разлике у амплитуди и брзини нервне проводљивости као параметара нервне регенерације код обе тестиране групе, али је констатовао, да је време хируршког рада било за 70 процената краће при употреби FG (85).

Једну од већих клиничких студија са употребом FG у репарацији повређеног фацијалног нерва приказали су *Sances-Ocando i Gavilan* 2019. године, обухватајући период од 2001. до 2017. године. У оквиру ове студије одрађено је 36. пацијената са повредом фацијалног нерва. Повређени нерв је реконструисан директном сутуром или применом слободног трансплантата (*n. hipoglossus*) уз примену FG код свих пацијената. Годину дана након реконструкције електрофизиолошким испитивњима користећи параметре *Hous-Brickman-ove* скале нису добили значајне разлике између испитаника уз благу предност пацијената код којих је примењена неуросутура са FG (86).

Анализирајући доступне експерименталне студије и нешто мањи број клиничких студија можемо закључити, да је дејство FG на процес неурорегенерације занемарљиво с тим, да се FG може користити у циљу стабилности неуросутура и као носач за разне факторе раста за које је доказан висок степен неурорегенеративног дејства.

Ако посматрамо временску дистанцу можемо закључити, да је употреба фактора раста једнако интересантна сада као и у току протекле деценије, при чему се број новопубликованих радова знатно увећао.

Из доступне литературе, да се приметити, да су студије које промовишу употребу PRP у неурорегенерацији доминантно експерименталне и захтевају још испитивања у доношењу коначних одлука за применом у клиничке сврхе.

Од укупно 8.499 анализираних клиничких студија већина њих је фокусирана на примену фактора раста у процесу регенерације костију, хрскавице, лечењу остеоартритиса и испитивању функције тромбоцита (70).

Велика Клиничка студија спроведена у САД која укључује 132. студије употребе PRP у терапијске сврхе из различитих специјалности наводи, да је највећи број испитивања спроведен у оквиру ортопедије (97. студија), пластичне и реконструктивне хирургије (19. студија), оралне и максилофацијалне хирургије (6. студија) и неурологије.

Испитивања мишићно-коштаног система чинило је 74% свих испитивања са доминантним терапијском применом PRP код остеоартритиса колена и тендинопатија. Укупно је 61% студија показало бенефит употребе PRP при чему треба нагласити, да основни проблем у усклађивању резултата јесте недовољно података о саставу PRP (33% студија је приказало резултате) (87).

Клиничка испитивања употребе PRP у процесу регенерације фацијалног нерва су оскудна. *Scala* и сар. открили су, да PRP има позитиван неуропротективни учинак на фацијални нерв код пацијената који су подвргнути суперфицијалној паротидектомији у поређењу са плацебо групом у малом рандомизованом контролном испитивању (88).

Ricci и сарадници, спровели су клиничку студију на 59. пацијената где је након операције бенигних тумора паротидне плјувачне жлезде уз конзервацију фацијалног нерва примењен PRP (21. пацијент) на преостали део жлезде. Забележене су клиничке карактеристике компликација, дужина хоспитализације и трајање сукционе дренаже. Парализа фацијалиса, саливарне фистуле (*Frey's syndrome*) и отржано зарастање, биле су чешће компликације у не-PRP групи, стога аутори препоручује употребу PRP за даља клиничка испитивања (89).

Када су у питању функционални исходи наших истраживања методом субјективне визуелизације покрета, електрофизиолошким и хистолошким анализама (након трансекције и репарације нерва), запажено је, да су покрети аурикуле пратили процес нервне регенерације, а број новостворених аксона директно је био пропорционалан брзини нервне проводљивости. Ово је пре свега утврђено у III и IV групи, где је коришћен PRP, што је у сагласности са истраживањима других аутора (65,67) у IV групи смо користили и FG, али његово неурорегенеративно дејство није потврђено, упоређујући резултате са II групом сви параметри истраживања не детектују активност FG.

Ради специфичног увида у добијене резултате, временске дистанце праћења степена опоравка фацијалног нерва након спроведене реконструкције у нашем раду је била подељена на два периода од 6. и 8. недеља.

За шест недеља смо се определили на основу потврђених резултата о временском периоду неурорегенерације фацијалног нерва који је евидентан након четири до шест недеља (63,68,69), као и на основу података који сугеришу, да је време дејства фактора раста у окружењу повређеног ткива између три и седам недеља (56), осма недеља је узета као параметар даљег дешавања у смислу регенерације аксон и реинервације мимичне мускулатуре (66,75).

Упоређујући наведену временску дистанцу закључили смо, да не постоји значајна разлика у електрофизиолошким и хистолошким праћеним параметрима, стога је период од шест недеља довољан за комплетну регенерацију фацијалног нерва применом PRP.

Резултати нашег истраживања су у складу са резултатима већине до сада објављених студија.

Из изнетих чињеница и када експерименталне резултате „пренесемо“ у клиничке студије, можемо рећи и да пацијенти и лекари подједнако морају бити стрпљиви јер је опоравак повређеног фацијалног нерва (било да је у питању нагњечење или потпун прекид нерва) спор, а оптимално време за побољшање функције је 4. до 6. недеља (67,68,69) док се потпуни опоравак нерва постиже у року од 5. до 9. месеци након појаве симптома (90).

Слично претходно објављеним истраживањима то и јесу ограничења наше студије, односно сазнања добијена у *in vivo* експериментима морају се пренети у клиничко окружење (88,89), како бисмо добили и званичну потврду успешности примене PRP-а у процесу регенерације фацијалног нерва код пацијената. То уједно треба да буде и наставак (следећа фаза) ове студије.

Отворена су и питања која се односе на прецизан састав и начин добијања PRP-а у циљу стандардизације поступака на основу чега би се могли упоређивати резултати са већом прецизношћу. Постизање побољшане брзине нервне проводљивости и броја новостворених аксона применом плазме богате тромбоцитима били би добар основ за истраживања бар у два правца.

Први правац би био, одређивање карактеристика тромбоцита у PRP препаратима у смислу одређивања старости тромбоцита, степена активације и апоптозе, функционалног одговора на стимулаторе агрегације, испитивања фенотипских карактеристика и квантификације секретованих/ослобођених фактора раста.

Други правац би био, манипулација одређеним популацијама тромбоцита у PRP у смислу добијања терапеутског препарата који најоптималније подстичу нервну активност, односно других ткива, према претходно дефинисаном садржају фактора раста.

6. ЗАКЉУЧАК

Главни закључак овог истраживања је да фактори раста добијени из аутологне плазме обогаћене тромбоцитима подстичу нервну регенерацију након повреде фацијалног нерва.

Овај закључак је изведен на основу електрофизиолошких и хистолошких анализа и методе визуализације покрета ушке на експерименталном моделу кунића.

1. Електромионеурографским анализама пре повреде нерва и након реконструкције у временском опсегу од шест и осам недеља утврђено је, да су се вредности латенце групе III где је употребљен PRP изједначиле са вредностима контролне стране.
2. Брзина нервне проводљивости код обе подгрупе („А“ и „Б“) групе III након реконструкције нерва показује вредности подударне са контролном страном.
3. Вредност амплитуде код групе III обе подгрупе такође је подударна са вредностима контролне стране, изражена је и процентуално на основу чега смо забележили успешност реконструкције код групе III изнад 95% .
4. Хистолошким и морфометриским анализама број новостворених аксона и Шванових ћелија код групе III обе подгрупе изједначен је са бројем аксона контролне стране и до четири пута је већи од броја аксона групе I и II, при чему је број аксона у директној пропорцији са бројем Шванових ћелија код групе III обе подгрупе, што указује на комплетну мијелинизацију нерва.
5. Степен заступљености везивног ткива указује на значајни редукцију истог код експерименталне групе III, описује се у траговима као и код посматраног препарата нерва контролне стране.
6. Формирање нових крвних судова са израженом васкуларном мрежом између фасцикулуса нерва и у перинеуријуму код III групе обе подгрупе, указује на висок степен ангиогенезе као и код контролне стране.
7. Однос брзине нервне проводљивости и број новоформираних аксона су у корелацији, односно број новоформираних аксона прати пораст брзине нервне проводљивости. Ове вредности код експерименталне групе III се по истеку шесте недеље изједначавају са вредностима контролне стране.
8. Методом субјективне визуализације покрета ушке утврђено је, да наведене параметре добијене електрофизиолошким и хистолошким анализама прате покрети ушке, тако да су код групе III по истеку шесте недеље покрети синхронизовани са покретима ушке контролне стране.
9. Сумирани резултати свих испитивања добијених након шест недеља (подгрупа „А“) не разликују се битно од резултата након осам недеља (подгрупа „Б“), те смо тиме закључили, да се време неопходно за регенерацију фацијалног нерва применом PRP одиграва у периоду до шест недеља након реконструкције.

Примена фактора раста добијених из аутологне плазме обогаћене тромбоцитима могу поспешити процес неурорегенерације повређеног фацијалног нерва са видљивим резултатима опоравка функције мимичне мускулатуре лица шест недеља након реконструкције нерва.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Sajadi MM, Sajadi MR, Tabatabaie SM. The history of facial palsy and spasm: Hippocrates to Razi. *Neurology*. 2011 Jul 12;77(2):174-8.
2. Jovic N. Facial paralysis: etiology, diagnosis and treatment. Belgrade: Military Publishing House; 2004.
3. Ricci E, Riva G, Dagna F, Cavalot AL. The use of platelet-rich plasma gel in superficial parotidectomy. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2019 Dec;39(6):363-366.
4. Grey H. *Anatomy of the Human Body*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; 20th ed., thoroughly rev. and re-edited by Warren H. Lewis, Bartleby.com, 2000.
5. Toulgoat F, Sarrazin JL, Benoudiba F, Pereon Y, Auffray-Calvier E, Daumas-Duport B, Lintia-Gaulter A, Desel HA. Facial nerve: From anatomy to pathology. *Diag Intervent Imag*. 2013; 94(10):1030-1042
6. Tubbs SR, Steck DT, Mortazavi MM, Cohen-Gadol AA. The nervus intermedius: a review of its anatomy, function, pathology, and role. *World Neurosurg*. 2013;79(5-6):763-767.
7. Patel AA. Facial nerve anatomy, 2015. <http://emedicine.medscape.com/article/835286>.
8. Petanjek Z, Milić V. Funkcionalna organizacija moždanih živaca. *Medicinar*. 1997:27-32
9. Šljivić, B.: Deskriptivna i topografska anatomija (glava i vrat). Beograd: Prosveta 1946
10. Seneviratne SO, Patel BC. Facial Nerve Anatomy and Clinical Applications. 2023 May 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FG): StatPearls Publishing; 2023 Jan
11. Kukumberg P, Karlik M, Beňova-Liszekova D, Beňo M, Pechan T, Farkaš R. New perspectives in human tear analysis? *Neuroendocrinol Lett* 2015;36(3):185-186.
12. Fitzgerald TMJ, Gruener G, Mtui E. *Clinical Neuroanatomy and Neuroscience*, 6th ed., Saunders/Elsevier, Edinburgh, UK, 2012.
13. Bento RF, de Brito RV, Sanchez TG. A rapid and safe middle fossa approach to the geniculate ganglion and labyrinthine segment of the facial nerve. *Ear Nose Throat J*. 2002;81(5):320-326.
14. Borle RM, Jadhav A, Bhola N, Hingnikar P, Gaikwad P. J. Borle's triangle: A reliable anatomical landmark for ease of identification of facial nerve trunk during parotidectomy. *Oral Biol Craniofac Res*. 2019 Jan-Mar;9(1):33-36.

15. Martínez Pascual P, Marañillo E, Vázquez T, Simon de Blas C, Lasso JM, Sañudo JR. Extracranial Course of the Facial Nerve Revisited. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019 Apr;302(4):599-608.
16. Isabel Esteves Costa, António Fontes Lima, Cátia Azevedo, Fernando Mar, Berta Madureira Rodrigues, Luís Dias Parotid gland surgery: short and medium-term results of morbidity and predictive factors for iatrogenic facial nerve injury *Acta Otorrinolaringológica Gallega* 6/6/2020
17. Chatellier A, Labbé D, Salamé E, Bénateau H. Skin reference point for the zygomatic branch of the facial nerve innervating the orbicularis oculi muscle (anatomical study). *Surg Radiol Anat*. 2013 Apr;35(3):259-62.
18. Yang HM, Won SY, Kim HJ, Hu KS. 2013. Sihler staining study of anastomosis between the facial and trigeminal nerves in the ocular area and its implications. *Muscle Nerve* 48: 545–550.
19. Won SY, Yang HM, Woo HS, Chang KY, Youn KH, Kim KS. 2014. Neuroanastomosis and the innervation territory of the mental nerve. *Clin Anat* 27: 598–602.
20. Gasser RF, May M. Embryonic development of the facial nerve. In *Facial nerve*. Thieme Inc, New York, 1985, pp. 3-20.
21. Dudek RW. *BRS Embriology*, sixth ed, Wolters Kluwer, Philadelphia, 2014.
22. Adameyko I, Fried K. The nervous system orchestrates and integrates craniofacial development: A review. *Front Physiol*. 2016;7:49.
23. Weglowski M, Woźniak W, Piotrowski A, Bruska M, Wegłowska J, Sobański J, Grzymisławska M, Łupicka J. Early development of the facial nerve in human embryos at stages 13-15. *Folia Morphol*. 2015; 74(2): 252-257.
24. Zhang W, Xu L, Luo T, Wu F, Zhao B, Li X.J The etiology of Bell's palsy: a review. *Neurol*. 2020 Jul;267(7):1896-1905.
25. Mistry RK, Hohman MH, Al-Sayed AA. Facial Nerve Trauma. 2023 Mar 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FG): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
26. Brown J, Hohman MH, Shermetaro C. StatPearls [Internet] StatPearls Publishing; Treasure Island (FG): 2023. Mar 1, Facial Nerve Intratemporal Trauma.
27. Gordin E, Lee TS, Ducic Y, Arnaoutakis D. Facial nerve trauma: evaluation and considerations in management. *Craniofac Trauma Reconstr*. 2015 Mar;8(1):1-13.

28. Diaz RC, Cervenka B, Brodie HA. Treatment of Temporal Bone Fractures. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2016 Oct;77(5):419-29.
29. Patel A, Lofgren DH, Varacallo M. StatPearls [Internet] StatPearls Publishing; Treasure Island (FG): 2022. Sep 12, Temporal Fracture.
30. Hohman MH, Bhama PK, Hadlock TA. Epidemiology of iatrogenic facial nerve injury: a decade of experience. *Laryngoscope*. 2014; 124(1):260-5.
31. Zourntou SE, Makridis KG, Tsougos CI, Skoulakis C, Vlychou M, Vassion A. Facial nerve: A review of the anatomical, surgical landmarks and its iatrogenic injuries. *Injury*. 2021; 52(8):2038-48.
32. Moussa, Hossam R.; Mlees, Mohamed A.; Abdelhamid, Amir F. Incidence and risk factors of facial nerve palsy after parotidectomy for benign parotid diseases *The Egyptian Journal of Surgery* 40(3):p 929-935, Jul–Sept 2021.22.
33. Stathopoulos P, Igoumenakis D, Smith WP. Partial Superficial, Superficial, and Total Parotidectomy in the Management of Benign Parotid Gland Tumors: A 10-Year Prospective Study of 205 Patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Feb;76(2):455-459.
34. Jeon Y, Lee H.J Ramsay Hunt syndrome. *Dent Anesth Pain Med*. 2018 Dec;18(6):333-337.
35. Picciolini O, Porro M, Cattaneo E, Castelletti S, Masera G, Mosca F, Bedeschi MF. Moebius syndrome: clinical features, diagnosis, management and early intervention *Ital J Pediatr*. 2016 Jun 3;42(1):56
36. Bogusiak K, Puch A, Arkuszewski P. *World J Pediatr*. Goldenhar syndrome: current perspectives. 2017 Oct;13(5):405-415
37. Lackey AE, Muzio MR. Di George Syndrome. *Stat Pearls Publishing, Treasure Island (FG)*, 21 Nov 2019.
38. Sanlaville D, Verloes A. CHARGE syndrome: an update. *Eur J Hum Genet*. 2007 Apr;15(4):389-99.
39. Bascarević V, Samardzić M, Rasulić L, Simić V: Reconstructive surgery of facial nerve injuries. *Acta Chir Jugosl* 2003, 50(1):63-67.
40. Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943;66:238–287. (Google Scholar)
41. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74:491–516.

42. House JW, Brackmann DE, Facial Nerve Grading System Otolaryngol Head Neck Surg 1985 93:146-47.
43. Lee HY, Park MS, Byun JY, Chung JH, Na SY, Yeo SG. Agreement between the Facial Nerve Grading System 2.0 and the House-Brackmann Grading System in Patients with Bell Palsy. Clin Exp Otorhinolaryngol. 2013 Sep;6(3):135-9.
44. Lee DH. Clinical Efficacy of Electroneurography in Acute Facial Paralysis J Audiol Otol. 2016 Apr;20(1):8-12.
45. Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, Aziz N, Razzaq A, Hussain R, de Aguilar JG, Sun T. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. Int J Biol Sci. 2020 Jan 1;16(1):116-134.
46. Dan Liu, Daguo Mi, Tuanjie Zhang, Yanping Zhang, Junying Yan, Yaxian Wang, Xuefeng Tan, Ying Yuan, Yumin Yang, Xiaosong Gu, Wen Hu. Tubulation repair mitigates misdirection of regenerating motor axons across a sciatic nerve gap in rats Sci Rep. 2018; 8: 3443.
47. Zhu GC, Xiao DJ, Zhu BW, Xiao Y: Repairing whole facial nerve defects with xenogeneic acellular nerve grafts in rhesus monkeys. Neural Regen Res 2022, 17(5):1131-1137.
48. Mościcka P, Przyłipiak A. History of autologous platelet-rich plasma: A short review. J Cosmet Dermatol. 2021 Sep;20(9):2712-2714.
49. Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. J Biol Regul Homeost Agents. 2012 Apr-Jun;26(2 Suppl 1):3S-22S.
50. Wang S, Liu X, Wang Y. Evaluation of Platelet-Rich Plasma Therapy for Peripheral Nerve Regeneration: A Critical Review of Literature. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Mar 1;10:808248.
51. Saez DM, Sasaki RT, Martins D de O, Chacur M, Kerkis I, da Silva MCP: Rat facial nerve regeneration with human immature dental pulp stem cells. Cell Transplant 2019, 28(12):1573-1584.
52. Sun Y, Zhang R, Mao X, Zhang M: Research of acellular xenogeneic nerve combined with adipose-derived stem cells and platelet rich plasma in repair of rabbit facial nerve injury Chin J Reparative Reconstr Surg 2018, 32(6):736-744.
53. Wang P, Zhao H, Yao Y, Lu C, Ma J, Chen R, Pan J: Repair of facial nerve crush injury in rabbits using collagen plus basic fibroblast growth factor. J Biomed Mater Res A 2020, 108(6):1329-1337.

54. Matsumine H, Sasaki R, Tabata Y, Matsui M, Yamato M, Okano T, Sakurai H: Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model: Facial nerve regeneration with bFGF-impregnated gelatin in rats. *J Tissue Eng Regen Med* 2016, 10:E559-567.
55. Fujimaki H, Matsumine H, Osaki H, Ueta Y, Kamei W, Shimizu M, Hashimoto K, Fujii K, Kazama T, Matsumoto T, Niimi Y, Miyata M, Sakurai H: Dedifferentiated fat cells in polyglycolic acid-collagen nerve conduits promote rat facial nerve regeneration. *Regen Ther* 2019, 11:240-248.
56. Huawei L, Weisheng W, Min H, Wenting B, Lijie C, Sanxia L, Peng C, Xinying T: Chitosan conduits combined with NGF microspheres repair facial nerve defects. *Neural Regen Res* 2013, 8(33):3139-3147.
57. Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World J Surg.* 2010 Apr;34(4):632-4.
58. Gardasevic M, Petkovic-Curcin A, Vojvodic D, Marjanovic U, Djurdjevic D, Jovic S, Vulović D, Matijević S: Assessment of efficacy of platelet rich plasma application in regeneration of the facial nerve in rabbits. *Vojnosanit Pregl* 2023, 80(4): 349-355.
59. Vanessa Ashalla , David Mortonb, Eddie Cluttonc A Declaration of Helsinki for animals *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2023, 50, 309-314
60. Gardašević M, Živić M, Djurdjević D, Petković-Ćurčin A. Application of different techniques in facial nerve reconstruction on experimental models. *Acta Veterinaria-Beograd.* 2023; 73(2):155-70.
61. Drekić D, Lozanče Olivera, Anatomija nervnog sistema, endokrinih žlezda, organa čula i kože domaćih životinja Beograd : Veterinarska komora Srbije, 2010.
62. Wissam Abdullah Alhayani, Maher MA, Omar Tariq Hammoodi Surgical Anatomy of Facial Nerve in Rabbits *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*, Vol.24, Issue 09, 2020
63. Costa, HJZR, da Silva, CF, Korn, GP and Lazarini, PR (2006). Posttraumatic facial nerve regeneration in rabbits. *Rev Bras Otorrinolaringol*;72(6):786-93.)
64. Gillett C.S. Selected drug dosages and clinical reference data. In: Manning P.J., Ringler D.H., Newcomer C.E., editors. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. second ed. Academic Press; 1994. pp. 467–472.
65. Guntinas-Lichius O, Volk GF, Olsen KD, Mäkitie AA, Silver CE, Zafereo ME, Rinaldo A, Randolph GW, Simo R, Shaha AR, Vander Poorten V, Ferlito A. Facial nerve

- electrodiagnostics for patients with facial palsy: a clinical practice guideline. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020 Jul;277(7):1855-1874.
66. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet-rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope*. 2007; 117(1):157-65.
 67. Cho HH, Jang S, Lee SC, Jeong HS, Park JS, Han JY, Lee KH, Cho YB: Effect of neuralinduced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model. *The Laryngoscope* 2010, 120(5):907–913.
 68. Liheng L, Jing C, Yang Y, Yanyan M, Lei X, Yuechen H, Jianfeng L, Haibo W: Platelet-rich plasma can release nutrient factors to promote facial nerve crush injury recovery in rats. *Saudi Med J* 2019, 40(12):1209-1217.
 69. Bayrak AF, Olgun Y, Ozbakan A, Aktas S, Kulan CA, Kamaci G, Demir E, Yilmaz O, Olgun L. The Effect of Insulin Like Growth Factor-1 on Recovery of Facial Nerve Crush Injury. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2017 Dec;10(4):296-302.
 70. R. Li, Li D. hui, H. Y. Zhang, J. Wang, Li X. kun, and J. Xiao, “Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration,” *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 41, pp. 1289–1300, 2020.
 71. Sanchez Rezza A, Kulahci Y, Gorantla VS, Zor F, Drzeniek NM. Implantable Biomaterials for Peripheral Nerve Regeneration-Technology Trends and Translational Tribulations. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Apr 27;10:863969.
 72. Yaqiong Zhu, Zhuang Jin, Jing Wang, Siming Chen, Yongqiang Hu, Yuexiang Wang et al Ultrasound-guided platelet-rich plasma injection and multimodality ultrasound examination of peripheral nerve crush injury npj Regenerative Medicine volume 5, Article number: 21 (2020).
 73. Şahin MM, Cayonu M, Dinc SK, Ozkocer E, Ilhan M, Uzunoğlu E, Elmas C, Yılmaz M, Akkol E: Effects of chitosan and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an animal model. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2022, 279(2):987-994.
 74. Sugiyama M, Ito T, Furukawa T, Hirayama A, Kakehata S. The effect of IGF-1 on the recovery of facial nerve function in a guinea pig model of facial palsy *J Physiol Sci*. 2020 Jun 8;70(1):28.
 75. Vieira AG, Guzen FP, de Paiva JRL, de Oliveira LC, Jales MCA, Lucena EES, Lucena VRDS, Morais HHA. Morphofunctional regeneration by mesenchymal stem cell and IGF-1 inoculation in a model of facial nerve crush injury in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2023 Mar-Apr;89(2):244-253.

76. Ma F, Zhu T, Xu F, Wang Z, Zheng Y, Tang Q, Chen L, Shen Y, Zhu J. Neural stem/progenitor cells on collagen with anchored bFGF as potential natural nerve conduits for facial nerve regeneration. *Acta Biomater.* 2017 Mar 1;50:188-197.
77. Barras FM, Kuntzer T, Zurn AD, Pasche P. Local delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves facial nerve regeneration after late repair *Laryngoscope.* 2009 May;119(5):846-55.
78. Wang Y, Zhao X, Huojia M, Xu H, Zhuang Y. Transforming growth factor- β 3 promotes facial nerve injury repair in rabbits. *Exp Ther Med.* 2016 Mar;11(3):703-708
79. Chao X, Xu L, Li J, Han Y, Li X, Mao Y, Shang H, Fan Z, Wang H. Facilitation of facial nerve regeneration using chitosan- β -glycerophosphate-NGF hydrogel *Acta Otolaryngol.* 2016 Jun;136(6):585-91.
80. Koopman JE, Duraku LS, de Jong T, de Vries RBM, Michiel Zuidam J, Hundepool CA. A systematic review and meta-analysis on the use of fibrin glue in peripheral nerve repair: Can we just glue it? *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2022 Mar;75(3):1018-1033.
81. Bento RF, Miniti A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in intratemporal facial nerve of cats. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1989;465:1-36.
82. R.F. Bento, A. Miniti Anastomosis of the intratemporal facial nerve using fibrin tissue adhesive *Ear Nose Throat J,* 72 (1993), pp. 663-672.
83. Sandrini FA, Pereira-Júnior ED, Gay-Escoda C. Rabbit facial nerve anastomosis with fibrin glue: nerve conduction velocity evaluation. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007 Mar-Apr;73(2):196-201.
84. Vasconcelos BC, Gay Escoda C, Vasconcellos RJ, Neves RF. Conduction velocity of the rabbit facial nerve: a noninvasive functional evaluation. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Apr-Jun;17(2):126-31.
85. C.J. Knox, M.H. Hohman, I.J. Kleiss, Facial nerve repair: fibrin adhesive coaptation versus epineurial suture repair in a rodent model *Laryngoscope,* 123 (2013), pp. 1618-1621
86. Sánchez-Ocando M, Gavilán J, Penarrocha J, González-Otero T, Moraleda S, Roda JM, Lassaletta L Facial nerve repair: the impact of technical variations on the final outcome. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019 Dec;276(12):3301-3308.
87. Jaron Nazaroff¹, Sarah Oyadomari¹, Nolan Brown¹, Dean Wang Reporting in clinical studies on platelet-rich plasma therapy among all medical specialties: A systematic review of Level I and II studies *PLOS ONE* April 23.2021.

88. Scala, M. et al. The use of platelet-rich plasma gel in patients with mixed tumour undergoing superficial parotidectomy: A randomized study. *In vivo* (Athens, Greece) 28, 121–124 (2014).
89. Ricci E, Riva G, Dagna F, Cavalot A.L. The use of platelet-rich plasma gel in superficial parotidectomy *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2019 Dec; 39(6): 363–366.
90. Orlando Guntinas-Lichius, Gerd Fabian Volk, Kerry D. Olsen, Antti A. Mäkitie, Carl E. Silver, Mark E. Zafereo, Alessandra Rinaldo, Gregory W. Randolph, Ricard Simo, Ashok R. Shaha, Vincent Vander Poorten, Alfo Ferlito Facial nerve electrodiagnostics for patients with facial palsy: a clinical practice guideline *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* (2020) 277:1855–1874.

Скраћенице:

PRP (*platelet-rich plasma*) - плазма богата тромбоцитима
PDGF (*platelet-derived growth factor*) - тромбоцитни фактор раста
TGF- β 1 (*transforming growth factor*) - трансформишући фактор раста
PDAF (*platelet-derived growth factor*) - фактор ангиогенезе
IGF-1 (*insulin-like growth factor*) - инсулину сличан фактор раста-
PF-4 (*platelet factor 4*) - тромбоцитни фактор 4
EGF (*epidermal growth factor*) - епидермални фактор раста
VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) - васкуларни ендотелни фактор раста
bFGF (*b fibroblast growth factor*) - базични фибробластни фактор
HGF (*hepatocyte growth factor*) - хепатоцитни фактор раста
NGF (*nerve growth factor*) - нервни фактор раста
FGF (*fibroblast growth factor*) - фибробластни фактор раста
CNF (*ciliary neutrotrophic factor*) - цилијарни неуротрофни фактор
GDNF (*glial derived neurotrophic factor*) - глијални неуротрофни фактор
BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) - неуротрофни фактор из мозга
FG (*fibrin glue*) - фибрински лепак
PGA- полигликолна киселина
EMNG- електромионеурографија
BNP - Брзина нервне проводљивости

Б И О Г Р А Ф И Ј А

Милка Гардашевић, максилофацијални хирург рођена је 1968. на Цетињу где је завршила основно и средње образовање. Стоматолошки факултет у Београду завршила је 1995. године са просечном оценом 8,43. У периоду од 1995. до 1997. године радила је у Клиничком центру Црне Горе. Специјализацију из оралне хирургије започиње 1997. године на Стоматолошком факултету у Београду где обавља специјалистички стаж од 1997. до 2000. године. Специјалистички испит из оралне хирургије је положила 2000. године са одличном оценом (5). Уписала је магистарске студије 2001. године на Стоматолошком факултету у Београду а магистарски рад под називом „Превенција крварења при оралнохируршким интервенцијама применом дезмопресина уз мере локалне хемостазе код болесника са *von Willebrandovom* болешћу” одбранила је 2005. године. Специјализацију из максилофацијалне хирургије започиње 2000. године у Војномедицинској академији од када и ради као стални члан колектива за максилофацијалну хирургију. Специјализацију из максилофацијалне хирургије завршава 2005 са одличном оценом (5). У периоду од 2012. до 2013. године на Медицинском факултету у Београду започиње стручно усавршавање из области експерименталне медицине и добија дозволу за рад са експерименталним животињама. Уписала је докторске студије на Медицинском факултету у Београду 2014. године а наставила 2022. године на Медицинском факултету у Крагујевцу.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

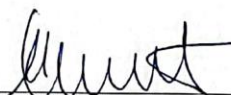
____ “Процена ефикасности примене плазме обogaћене тромбоцитима у процесу регенерације фацијалног нерва код кунића „

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У _____ Крагујевцу _____, _____ 2024 _____ године,


_____ потпис аутора

Образац 2

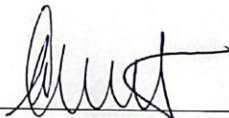
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

__ “Процена ефикасности примене плазме обogaћене тромбоцитима у
процесу регенерације фацијалног нерва код кунића”

истоветне.

У __ Крагујевцу ____, ____ 2024 ____ године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Гардашевић Милка,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Процена ефикасности примене плазме обogaћене тромбоцитима у процесу регенерације фацијалног нерва код куниће“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

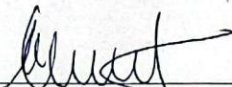
☐ не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ☒ 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У __Крагујевцу ____, ____ 2024 ____ године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>