

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ ТАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПІДЛІСЕЦЬКИЙ АНДРІЙ ТЕОФІЛОВИЧ

УДК: [617.57/.58-001.1-005.4-06:616.747/.748-002.4]:57.089:001.891.5(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ НА ІШЕМІЗОВАНІ М'ЯЗИ ПРИ
ПІСЛЯТРАВМАТИЧНІЙ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ
ДОСЛІДЖЕННЯ)

22 «Охорона здоров'я»; 222 – медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Ідеї, результати і тексти інших авторів використовуються з посиланням на відповідне джерело

_____ Підлісецький А.Т.

Науковий керівник: Долгополов Олексій Вікторович, доктор медичних наук

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

***Підлісецький А. Т.* Вплив клітинних технологій на ішемізовані м'язи при післятравматичній ішемії кінцівки (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD) за спеціальністю 22 «Охорона здоров'я»; 222 – медицина. – ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, 2024

У дисертаційній роботі розкрита проблема впливу клітинних технологій на м'язові некрози у разі посттравматичної ішемії кінцівок.

Мета дослідження – дослідити вплив клітинних технологій на некрози м'язів при післятравматичній ішемії кінцівки.

У експерименті проводилося дослідження розвитку структурних змін м'язової тканини на моделі післятравматичної ішемії кінцівки та за умов введення концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини. У терміни 5, 15 та 30 діб після моделювання 6-годинної турнікетної ішемії оцінювали структурні зміни м'язової тканини, які порівнювали з сонографічними даними. На основі результатів біохімічних досліджень поставлено завдання визначити можливі ефекти впливу концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини на рівень пероксидації у пошкоджених тканинах скелетних м'язів та відповідь антиоксидантної системи на післятравматичну ішемію та введення досліджуваних клітинних суспензій. Дослідження змін периферійних нервів кінцівки на тлі ішемічного та травматичного ушкодження скелетних м'язів стало окремим завданням роботи.

Результати експериментальних досліджень дозволили встановити особливості впливу концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини на

динаміку структурних змін м'язів та нервів кінцівки після перенесеної турнікетної ішемії. Показано розвиток некрозу та сполучної тканини у пошкодженій м'язовій тканині, особливості топографії некротичних ділянок у скелетних м'язах гомілки. За допомогою ультрасонографічного та гістологічного досліджень виявлено мозаїчність некротичних ділянок. В термін 15 діб некроз прогресував, його окремі ділянки у субфасціальній зоні об'єднувались з тенденцією до збільшення некротизованих ділянок та заміщенням сполучною тканиною. На 30 добу показано достовірне збільшення питомої щільності сполучної тканини, тенденція до пригнічення її розвитку на тлі введення тромбоцитарної плазми і аспірату клітин кісткового мозку. Введення у пошкоджені тканини гомілки стромально-васкулярної фракції жирової тканини не позначилось на редукції або пригніченні розвитку некротичних ділянок, але супроводжувалось збільшенням запальних реакцій.

Вперше проведено сонографію м'язів гомілки і оцінено δ -ентропію пошкоджених тканин. Показано збільшення ентропії на 5 добу пошкодження, рівень якої у наступні терміни не відрізнявся від контрольних. Зроблено висновок про те, що сонографія у дослідженнях некротичних ділянок скелетних м'язів кінцівки має цінність тільки на ранніх термінах після пошкодження.

Досліджено структурні зміни периферійних нервів кінцівки, сідничого нерва та великогомілкового нерва, після перенесеної турнікетної ішемії. Показано відмінність ураження периферійних нервів у порівнянні із скелетними м'язами. Виявлено збереження основних структурних утворень нервових стовбурів у сідничому нерві, пошкодження тільки поодиноких нервових волокон у великогомілковому нерві. Введення концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини не позначилось на морфології периферійних нервів; дослідження щільності нервових волокон не продемонстрували статистично значущої різниці. Показано, що 6-годинна ішемія, розвиток некротичних ділянок у субфасціальній ділянці

скелетних м'язів та утворення рубцевої тканини не мали значного впливу на морфологію периферійних нервів кінцівки, що є важливим у вивченні ішемічної контрактури.

Результати експериментів дали можливість виявити ознаки регенеративних процесів у ішемізованих скелетних м'язах гомілки після турнікетної ішемії. Поява багатоядерних м'язових волокон не межі з некрозами і ділянками колагеногенезу оцінено як прояви структурної регенерації м'язових волокон. Зроблено висновок, що клітинні реакції мають досить ізольований характер, виявляються тільки в окремих м'язових волокнах, на межі з ділянками механічного та ішемічного пошкодження м'язової тканини. Виявлено мозаїчність структурних змін м'язів у субфасціальній ділянці та появи ознак регенерації м'язових волокон на 5 добу після пошкодження і тенденцію до збільшення кількості таких м'язових волокон на 15 добу досліджень. Порівняльне дослідження пошкоджених скелетних м'язів після введення тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини дозволило виявити відмінності клітинних реакцій у перифокальній ділянці некрозів. Тенденцію до збільшення щільності м'язових волокон з чисельними ядрами, як прояв регенеративного потенціалу, виявлено на 15 добу після введення тромбоцитарної плазми та аспірату клітин кісткового мозку. Разом з тим, подібні клітинні реакції на тлі введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини виявлено вже на 5 добу, але розвиток запальних реакцій і атрофія м'язової тканини мали негативний вплив на збереження морфології скелетних м'язів на 30 добу. У роботі одержано результати, які вказують на те, що некроз та атрофія м'язової тканини є незворотніми наслідками 6-годинної ішемії, а виявлені клітинні реакції на тлі введення досліджуваних клітинних технологій не позначались на відновленні загальноморфологічної організації м'язової тканини і є підґрунтям для наступних досліджень.

Показано динаміку змін рівня продуктів пероксидації та відповіді ферментативної антиоксидантної системи у скелетних м'язах на ішемічне та травматичне пошкодження. Виявлено, що гіперпродукція нітрит-аніону NO^{2-} відбувалась на протязі всіх термінів дослідження і не мала жодних ознак пригнічення, що вказує на тривалу продукцію токсичного метаболіту у ішемічно ушкоджених м'язах, незважаючи на достовірно менший рівень деяких продуктів пероксидації ліпідів і білків, як ТБК-реагуючі продукти і ДНФГ. Встановлено збільшення активності каталази та супероксиддисмутази на 15 добу, що може вказувати на реакцію пошкоджених тканин на прогресуючий некроз м'язової тканини і розвиток запальної реакції. У відповідь на введення концентрату тромбоцитарної плазми та клітин аспірату кісткового мозку виявлено зменшення утворення нітрит-аніону NO^{2-} у термін 15 і 30 доби і часткове відновлення продуктів окисної модифікації білків, тоді як введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини не показало вірогідного впливу на продукцію та обмін цих метаболітів. Встановлене збільшення активності ферментів каталази, супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази щодо контрольних значень та пошкоджених м'язів оцінено як відповідь антиоксидантної системи на введення досліджуваних клітинних суспензій та можливу активацію ендogenous протекторних механізмів у пошкодженій м'язовій тканині.

Таким чином, у роботі проведено аналіз динаміки розвитку некрозу та атрофії м'язової тканини, визначено основні структурні зміни скелетних м'язів та периферійних нервів гомілки після 6-годинної механічно-індукованої ішемії, досліджено зміни перекисно-відновного стану пошкоджених тканин і оцінено ефекти впливу концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини на визначені показники. Експериментальне вивчення морфологічних та біохімічних змін скелетних м'язів гомілки дозволило виявити деякі позитивні ефекти досліджуваних клітинних суспензій і недоліки введення стромально-васкулярної

фракції жирової тканини.

Ключові слова: посттравматична ішемія кінцівки, некроз м'язів, периферійний нерв, збагачена тромбоцитами плазма, концентрат клітин кісткового мозку, стромально-васкулярна фракція жирової тканини, компартмент-синдром, кістково-м'язова, система, сила м'язу, репаративна, регенерація, фіброміалгія, регенеративні, технології, біохімічні, зміни, креатинін, колагеназа.

ABSTRACT

Pidlisetsky A.T. The effect of cellular technologies on ischemical muscle in the posttraumatic ischemia of the extremities (experimental study). – Qualifying work on manuscript rights.

The dissertation on competition of a scientific degree of the Doctor of Philosophy in medical sciences on specialty (222 – Medicine). – State Institution “Institute of Traumatology and Orthopaedics of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2024.

In the dissertation, the problem of the effect of cellular technologies on muscle necrosis in the case of post-traumatic limb ischemia is revealed. In the experiment, the development of structural changes in muscle tissue was studied on the model of post-traumatic limb ischemia and under the conditions of administration of platelet rich plasma, bone marrow aspirate cell concentrate, and stromal-vascular fraction of adipose tissue. In terms of 5, 15, and 30 days after simulation of 6-hour tourniquet ischemia, the structural changes of muscle tissue, the development of connective tissue in areas of necrosis were evaluated and compared with the results of sonography. Based on the results of biochemical studies, the aim was set to determine the possible effects of platelet rich plasma, bone marrow aspirate cell concentrate, and stromal-vascular fraction of adipose tissue on the level of peroxidation in damaged skeletal muscle tissues and the response of the antioxidant system to post-traumatic ischemia and the

introduction of the studied cell suspensions. The study of changes in the peripheral nerves of the limb against the background of ischemic and traumatic damage to skeletal muscles became a separate task of the work.

The results of the experimental studies made it possible to establish the peculiarities of the effect of platelet rich plasma, bone marrow aspirate cell concentrate, and stromal-vascular fraction of adipose tissue on the dynamics of structural changes in the muscles and nerves of the limb after a tourniquet ischemia. The development of necrosis and connective tissue in the damaged muscle tissue, features of the topography of necrosis in the skeletal muscles of the shin are shown. Based on ultrasonographic and histological studies, the mosaic nature of necrosis was revealed. Within 15 days, the necrosis progressed, its individual areas in the subfascial zone were united with a tendency to increase the necrotic areas and their replacement by connective tissue. On the 30th day, a significant increase in the specific density of the connective tissue, a tendency to suppress its tear, against the background of the introduction of platelet rich plasma and bone marrow aspirate cell concentrate was shown. The introduction of the stromal-vascular fraction of adipose tissue into the damaged tissues of the shin did not affect the reduction or suppression of the development of necrosis but was accompanied by an increase in inflammatory reactions.

Sonography of the shin muscles was performed for the first time and the δ -entropy of the damaged tissues was assessed. An increase in entropy on the 5th day of damage is shown, the level of which in the following periods did not differ from the control. It was concluded that sonography in the investigation of necroses of the skeletal muscles of the limb has value only in the early stages after damage.

The structural changes of the peripheral nerves of the limb, the sciatic nerve and the tibial nerve after the tourniquet ischemia were studied. The difference between damage to peripheral nerves compared to skeletal muscles is shown. Preservation of

the main structural formations of the nerve trunks in the sciatic nerve, damage to only single nerve fibers in the tibial nerve was revealed. Administration of platelet plasma concentrate, bone marrow aspirate cell concentrate, and stromal-vascular fraction of adipose tissue did not affect the morphology of peripheral nerves; studies of nerve fiber density did not have a statistically significant difference. It was shown that 6-hour ischemia, the development of necrosis in the subfascial area of skeletal muscles and the formation of scar tissue did not have a significant effect on the morphology of the peripheral nerves of the limb, which is important in the study of ischemic contracture.

The results of the experiments made it possible to detect some signs of regenerative processes in damaged skeletal muscles of the shin after damage. The appearance of multinucleated muscle fibers bordering on necrosis and areas of collagenogenesis was assessed as a manifestation of structural regeneration of muscle fibers. It was concluded that the detected cellular reactions represent quite isolated phenomenon, they are found only in individual muscle fibers, on the border with areas of mechanical and ischemic damage to muscle tissue. The mosaic of structural changes of the muscles in the subfascial area and the appearance of some signs of regeneration of muscle fibers on the 5th day after the injury and the tendency to increase the number of such muscle fibers on the 15th day of research were revealed. A comparative study of damaged skeletal muscles after administration of platelet rich plasma, bone marrow aspirate cell concentrate, and stromal-vascular fraction of adipose tissue revealed some differences in cellular reactions in the perifocal area of necrosis. A tendency to increase the density of muscle fibers with numerous nuclei, as a manifestation of regenerative potential, was detected on the 15th day after the application of platelet rich plasma and bone marrow aspirate cell concentrate. At the same time, similar cellular reactions against the background of the introduction of the stromal-vascular fraction of adipose tissue were shown already on the 5th day, but the development of inflammatory

reactions and muscle tissue atrophy had negative consequences for the preservation of skeletal muscle morphology on the 30th day. That is, important results were obtained in the work, which indicate that necrosis and atrophy of muscle tissue are irreversible consequences of 6-hour ischemia, and the detected cellular reactions against the background of the introduction of the studied cellular technologies did not affect the restoration of the general morphological organization of muscle tissue and are the basis for further research.

The dynamics of changes in the level of peroxidation products and the response of the enzymatic antioxidant system in skeletal muscles to ischemic and traumatic damage are shown. It was found that the hyperproduction of nitrite anion NO^{2-} occurred at all times of the experiments and had no signs of inhibition, indicating the long-term production of a toxic metabolite in ischemically damaged muscles, despite the significantly lower level of some lipid and protein peroxidation products, such as TBA-reactive products and DNPH. An increase in the activity of catalase and superoxide dismutase on the 15th day was established, which may indicate the reaction of damaged tissues to the progressive necrosis of muscle tissue and the development of an inflammatory reaction. In response to the introduction of platelet rich plasma and bone marrow aspirate cell concentrate, a decrease in the formation of nitrite anion NO^{2-} was shown within 15 and 30 days and a partial recovery of the products of oxidative modification of proteins, while the introduction of the stromal-vascular fraction of adipose tissue had no probable effect on the production and exchange of these metabolites. The determined increase in the activity of the enzymes catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase relative to control values and damaged muscles was evaluated as a response of the antioxidant system to the introduction of the studied cell suspensions and possible activation of endogenous protective mechanisms in damaged muscle tissue.

Thus, the work represents the analysis of dynamics of the development of necrosis and atrophy of muscle tissue, determination of the main structural changes of skeletal muscles and peripheral nerves of the shin after 6-hour mechanically induced ischemia, investigation of changes in the redox status of damaged tissues, and evaluation of the effects of the platelet rich plasma, bone marrow aspirate cell concentrate, and stromal-vascular fraction of adipose tissue for specified parameters. The experimental study of morphological and biochemical changes in the skeletal muscles of the shin made it possible to reveal some positive effects of the studied cell suspensions and the disadvantages of introducing the stromal-vascular fraction of adipose tissue.

Key words: post-traumatic limb ischemia, muscle necrosis, peripheral nerve, platelet rich plasma, bone marrow aspirate cell concentrate, stromal-vascular fraction of adipose tissue, musculoskeletal system, compartment syndrome, collagenase, biochemical changes, creatinine, regenerative technologies, muscle strength, fibromyalgia, reparative regeneration.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних виданнях, включених до наукометричної бази Scopus:

1. Pidlisetskyu, A., Savosko, S., Dolhopolov, O., Makarenko, O. (2021). Peripheral nerve lesions after a mechanically induced limb ischemia. *Georgian Medical News, Jan* (310), 165-169. <https://www.geomednews.com/v310-january-2021.html>. (Здобувач особисто брав участь у виконанні всіх експериментальних досліджень, що ввійшли до матеріалу статті. Автор брав участь в розробці техніки забору клітинних субстратів. Здійснив аналіз ефективності застосування клітинних технологій при посттравматичній ішемії та підготував публікацію до друку).

2. Pidlisetskyu, A., Savosko, S., Gayovich, I., Dolhopolov, O., Biliavskiy, V. (2023). The ultrasonography examination of skeletal muscles in traumatic ischemia (experimental study). *Wiadomosci Lekarskie Medical Advances, 76*(1), 175-181. doi: 10.36740/WLek202301124. (Здобувач брав участь в розробці ультрасонографічних методик дослідження змін некрозів та технологічних підходів до застосування клітинних технологій при посттравматичній ішемії кінцівок. Брав участь в аналізі результатів дослідження та їхній інтерпретації).

Стаття у періодичному виданні, включеному до наукометричної бази Web of Science:

3. Підлісецький, А.Т., Косякова, Г.В., Горідько, Т.М., Бердишев, А.Г., Мегедь, О.Ф., Савосько, С.І., Долгополов, О.В. (2021). Введення збагаченої тромбоцитами плазми або концентрованого клітинного аспірату кісткового мозку після механічноіндукованої ішемії покращує біохімічні показники в скелетних м'язах. *Український Біохімічний Журнал, 93*(3), 30-38. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.030>. (Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).

Статті у виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України:

4. Pidlisetskyu, A. T. (2021). Damages of neuromuscular system after mechanical-induced limb ischemia (Experimental Study). *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 2, 58-62. <https://visnyk.uaot.com.ua/index.php/journal/article/view/69> (Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).

5. Страфун, С.С., Підлісецький, А.Т., Савосько, С.І., Гайович, І.В., Долгополов, О.В. (2021). Ультрасонографічне дослідження скелетних м'язів в умовах травматичної ішемії (експериментальне дослідження). *Журнал Національної Академії Медичних Наук України*, 27(2), 110-111. <http://journal.amnu.gov.ua/archive-ua/2021-27-2> (Здобувач брав участь в розробці ультрасонографічних методик дослідження некрозів та технологічних підходів до застосування клітинних технологій при посттравматичній ішемії кінцівок. Брав участь в аналізі результатів дослідження та їхній інтерпретації).

6. Pidlisetsky, A., Dolhopolov, O., Savosko, S., & Makarenko, O. (2023). Дослідження структурних змін у субфасціальній ділянці скелетних м'язів гомілки після травматичної ішемії та впливу регенеративних технологій на відновлювальні процеси (експериментальне дослідження). *Ортопедія, травматологія та протезування*, (4), 63–69. <https://doi.org/10.15674/0030-59872021463-69> <http://otp-journal.com.ua/article/view/251432> (Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації (тези доповідей):

7. Підлісецький, А.Т., Савосько, С.І., Гайович, І.В., Долгополов, О.В., Білявський, В.О. (2021, 2-4 вересня). Ультрасонографічне дослідження скелетних

м'язів в умовах травматичної ішемії (Експериментальне дослідження). Матеріали п'ятої Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лікування патології суглобів та ендопротезування», Запоріжжя-Приморськ, С.69. *(Здобувач особисто розробив дизайн дослідження, провів збір даних ультразвукографічного дослідження, його всебічний аналіз та статистичну обробку, написав та підготував публікацію до друку.)*

8. Підлісецький, А.Т., Долгополов, О.В., Савосько, С.І., Гайович, І.В., Білявський, В.О. (2021). Вплив клітинних технологій на некротичні зміни ішемізованих м'язів кінцівок (експериментальне дослідження). Науково-практична конференція з міжнародною участю «Регенеративні технології в травматології та ортопедії», Київ, 28.10.2021 - 29.10.2021. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

9. Pidlisetskyu, A., Dolhopolov, O., Gaiovych, I., Bezruchenko, S., Siforov, D., Biliavskyi, V., Kulyk, Y. (2022, June 22-24). Poster presentation: Volkmann's Contracture. The Influence Of Cell Technology On The Reduction Of Necrosis (Experiment Study), 23rd EFORT Annual Congress held in Lisbon, Portugal.

10. Підлісецький, А.Т., Долгополов, О.В., Савосько, С.І., Макаренко, О.М. (2023). Морфологічні особливості атрофії м'язів кінцівки на моделі травматично-індукованої ішемії. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвячена пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю. Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці» Київ, 8-9 червня (с. 132). *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку. Інтерпретація отриманих результатів здійснена разом із співавторами).*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	1
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	15
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	46
2.1. Методика проведення експерименту	46
2.2. Методика гістологічного дослідження	55
2.3. Методика електронної мікроскопії	56
2.4. Методика морфометричного дослідження	56
2.5. Біохімічні дослідження	57
РОЗДІЛ 3. СТРУКТУРНІ ЗМІНИ У НЕКРОТИЗОВАНИХ М'ЯЗАХ ПРИ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНІЙ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ	63
3.1. Наукове підґрунтя до експериментального вивчення впливу тканинних технологій на розвиток некрозів у м'язах кінцівки при післятравматичній ішемії	63
3.2. Ультрасонографічне дослідження скелетних м'язів в умовах травматичної ішемії	66
3.3. Макроскопічне дослідження м'язів гомілки після моделювання ішемії	69
3.4. Результати гістологічних досліджень м'язів гомілки на тлі ішемічного пошкодження кінцівки	71
РОЗДІЛ 4. Пошкодження сідничного нерва після ішемічного пошкодження кінцівки	87
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ РЕАКТИВНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНОГО ПЕРИОДУ ІШЕМІЧНОЇ КОНТРАКТУРИ ТА	

МОЖЛИВІСТЬ ВПЛИВУ НА НЕКРОТИЗОВАНІ М'ЯЗИ	<u>100</u>
5.1. Результати досліджень впливу концентрату тромбоцитарної плазми на некротичні зміни скелетних м'язів	<u>100</u>
5.2. Результати досліджень впливу концентрату клітин кісткового мозку на некротичні зміни скелетних м'язів	<u>107</u>
5.3. Результати досліджень впливу аспірату клітин жирової тканини на некротичні зміни скелетних м'язів	<u>113</u>
5.4. Результати морфометричної оцінки скелетних м'язів гомілки на тлі ішемічного пошкодження кінцівки та застосування клітинної терапії	<u>121</u>
РОЗДІЛ 6. МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ У НЕКРОТИЗОВАНИХ НЕРВАХ ТА М'ЯЗАХ ПРИ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНІЙ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ ТА ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ НА ВІДНОВНІ ПРОЦЕСИ	<u>131</u>
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	<u>140</u>
ВИСНОВКИ	<u>150</u>
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	<u>153</u>
Додаток А	<u>176</u>
Додаток Б	<u>178</u>

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ADSCs	– Adipose Derived Stem Cells
PRP	– збагачена тромбоцитами плазма
VEGF	– судинний ендотеліальний фактор росту
КС	– компартмент синдром
ІК	– ішемічна контрактура
ПФТ	– підфасціальний тиск
КФФ	– кістково-фасціальний футляр
ПФС	– п'ястно-фалангові суглоби
МФС	– міжфалангові суглоби
МСК	– мезенхімальні стовбурові клітини
СКЖТ	– стовбурові клітини жирової тканини
ГСК	– гемопоетичні стовбурові клітини
АЖТ	– аспірат жирової тканини
АКМ	– аспірат кісткового мозку
ТП	– тромбоцитарна плазма
ЛФК	– лікувальна фізична культура
СОД	– супероксиддисмутаза
КАТ	– каталази
ДНФГ	– дифенілгідрозон
ГП	– глутатіонпероксидаза
ГР	– глутатіонредуктаза
АФК	– активні форми кисню
ДК	– дієнові кон'югати
МДА	– малоновий діальдегід

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Компартмент синдром (КС) вважається одним з найтяжчих ускладнень, що виникає після травм кінцівок [144]. КС описується як патологічний процес, при якому підвищений підфасціальний (тканинний) тиск (ПФТ) у замкнутому кістково-фасціальному просторі (футлярі) зменшує перфузію м'язів, спричиняючи їх ішемію. У разі відсутності адекватного лікування, при компартмент синдромі відбуваються незворотні зміни у м'язах та нервах кінцівок, що призводить до важких наслідків, починаючи від формування ішемічної контрактури (ІК) до смерті постраждалого. На сьогоднішній день найбільш ефективною профілактикою розвитку ІК вважається вчасно виконана фасціотомія кістково-фасціальних футлярів (КФФ) травмованої кінцівки [9; 21]. Стосовно ішемічної контрактури, хотілось би зазначити, що її так би мовити, «класична» клінічна за R.Volkmann (1881) картина, майже не зустрічається. Проте при високоенергетичній травмі ІК набуває більш тяжких форм у функціональному відношенні. Не вирішеною проблемою є лікування пацієнтів у реактивно-відновлювальному періоді ІК. Аналіз літературних даних останніх 10 років виявив, що у світі панує пасивна лікувальна тактика або тактика спостереження на протязі 9 – 18 місяців реактивно-відновлювального періоду ІК. Нагадаємо, що реактивно-відновлювальний період це період коли після перенесеного КС формуються некрози у межах КФФ. Формування некротів починається після гострого періоду ІК, тобто через тиждень від КС і закінчується через 9 місяців на верхній кінцівці та 18 місяців на нижній кінцівці, фіброзним переродження м'язів [84; 131].

Згідно даних сучасної літератури основними, так би мовити класичними лікувальними заходами, у цьому періоді є консервативна терапія, починаючи від антиоксидантної та вітамінотерапії до ЛФК масажу. Серед активних хірургічних заходів у разі компресійно-ішемічної нейропатії периферичних

нервів - виконують їх відновлення (шов, пластика) у разі ушкодження та невроліз, у разі стиснення рубцями, що формуються на місці некрозів. Проте незважаючи на значні досягнення оперативної хірургії нервів і судин кінцівок, що ґрунтуються на застосуванні різноманітних мікрохірургічних технік, результати операцій на нервах в умовах ішемії у багатьох пацієнтів залишаються незадовільними [144].

Таким чином, начебто, можна поставити крапку і спостерігати, як поступово формуються контрактури та деформації кисті чи стопи, а потім у резидуальному періоді ІК застосовувати активну оперативну тактику (артродезування, сухожилко-м'язові транспозиції тощо) [11]. Однак лишається низка питань, що потребують подальшого дослідження і вивчення, в аспекті можливого терапевтичного впливу на некрози, їхню редукцію і, тим самим, профілактику подальшого формування контрактур кисті чи стопи [1; 2].

Сучасне консервативне лікування ІК є комплексним. Воно складається з медикаментозного, фізіотерапевтичного і функціонального компонентів [60]. Широко використовуються препарати, які поліпшують синтез фосфоліпідів і мембран клітин, сприяють синтезу макроергічних фосфатів (ніколете, дибазол, метіонін, прозерин, вітаміни групи В тощо) [20; 21; 26; 27]. Останнім часом широко використовують аденозин, його терапевтичний ефект пов'язаний із стимуляцією ангиогенезу. Він діє як вазодилататор, дає антитромбоцитарний та антинейтрофільний ефект, справляє регулюючий вплив на метаболізм кисню [141]. S.P. Frey (2012) [71] уперше описав позитивний ефект, від застосування hSM-MSC-людських мезенхімальних синовіальних клітин на некротизовані ділянки ішемізованих м'язів. На волонтерах випробувано ефект генної інженерії. Використовували терапевтичний ефект VEGF (судинний ендотеліальний фактор росту) при генній терапії ішемізованої кінцівки в реактивно-відновлювальний період. Проникнення в клітини, які потенційно могли некротизуватися, здійснювали за допомогою аденовірусів, що кодовані VEGF чинником та β -

галактозидазою. Вже на 3-тю добу спостерігалась інверсія «мозаїчних» некрозів у *m. tibialis posterior*. Однак зазначені лікувальні заходи перебувають ще на стадії експериментальних розробок, а вартість цих методик надто велика. Серед фізіотерапевтичних заходів широко застосовують електрофорез йоду калію, електростимуляцію м'язів, парафінові аплікації тощо. Проте їх застосування дає місцевий ефект, що не може зупинити розвиток некрозів.

Аналіз літературних даних виявив збільшення зацікавленості фахівців різних медичних галузей, щодо вивчення можливих фізіологічних механізмів покращення регенераторних можливостей ішемізованих тканин, зокрема м'язів серця та головного мозку [190]. Найбільш перспективним та сучасним напрямком у цьому аспекті є клітинна терапія із застосуванням стовбурових клітин. Перші спроби виділити стовбурові клітини з жирової тканини були здійснені J. Rodbell та F. Jones у 60-их роках минулого сторіччя [33]. Однак стрімкий розквіт цього напрямку розпочався тільки у 1998 році, коли була опублікована стаття F.H. Gage в журналі *Cell therapy // Nature* [46], та одночасно групою авторів з Вінконсійського університету на чолі з Джеймсом Томпсоном у журналі «Science» було опубліковано дві статті: «Ембріональні стовбурові клітини, що видалені з бластоцистов людини» та «Новий потенціал людських ембріональних стовбурових клітин». З моменту цих публікацій настала нова ера застосування клітинної терапії у лікуванні багатьох хвороб, зокрема ішемічної хвороби серця, дитячого церебрального паралічу, інсульту головного мозку тощо [33].

Згідно визначення Всесвітньої організації охорони здоров'я, клітинна терапія являє собою новий напрямок, коли для лікування застосовуються живі клітини різного походження, які в організмі пацієнта здатні активно функціонувати, в результаті чого спостерігається покращення або модифікація функції органу або тканини, та відновлення, чи заміна втраченої функції.

Враховуючи те, що клонування та диференціація клітин є довготривалим і вартісним процесом, в ортопедичній практиці найбільш широко застосовуються

клітини, які отримані з жирової тканини, кісткового мозку та плазми крові. Отриманні з цих тканин стовбурові клітини можуть бути охарактеризовані як «будівельники» організму, що активують регенераторні можливості ушкоджених тканин; до того ж вони активують протизапальні процеси, а також беруть участь у формуванні нових кровоносних судин (неоангіогенез). На Всесвітній конференції, присвяченій дії стовбурових клітин, у Нью Йорку (2006), був прийнятий консенсус щодо доказовості терапевтичної дії стовбурових клітин, яка полягає в можливості трансформації у інші клітини, міграція до ушкоджених тканин організму, а також приживленні в ушкоджених тканинах і органах та відновленні функції цих тканин та органів [115].

Стовбурові клітини дорослої людини можна поділити на три основні групи: гемопоетичні (кровотворні), мультипотентні мезенхімальні (стромальні) та тканинспецифічні клітини-попередниці. У людини налічується всього понад 220 видів різних клітин. При цьому стовбурові клітини зберігаються в депо та продовжують виконувати свої функції і в дорослому організмі. За допомогою них відбувається оновлення тканин організму та їх відновлення, а отже, стовбурові клітини можуть бути виділені у людей різного віку. Механізм відновної дії стовбурових клітин пояснюють їх здатністю диференціюватись в різні клітини, таким чином відновлювати пошкоджені органи, та за допомогою продукції різноманітних факторів впливати на функціональну активність інших клітин. В залежності від захворювання, віку та стану пацієнта, кращим може бути те чи інше джерело стовбурових клітин.

Стосовно стовбурових клітин жирової тканини, за рекомендаціями «Міжнародного товариства по застосуванню технологій пересадки мезенхімальних стовбурових клітин, що отримані з жирової тканини», їх прийнято називати ADSCs (Adipose Derived Stem Cells) або стромально-васкулярною фракцією. Вона складається з судинних клітин (ендотеліоцити, перицити, клітини крові тощо) та фібробластоподібних клітин, що

розташовуються уздовж капілярів - їх називають мультипотентними мезенхімальними або стромальними стовбуровими клітинами. Мезенхімальні клітини жирової тканини мають високу пластичність [81]. Найбільш універсальними з них є мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) - вони виявлені в кістковому мозку, в жировій тканині і в незначних кількостях в інших тканинах. Ці клітини можуть давати початок різноманітним клітинам кісткової, хрящової, м'язової і, можливо, деяких інших тканин. Там же присутні гемопоетичні (кровотворні) стовбурові клітини (ГСК), з яких утворюються всі клітини крові. Вони знаходяться у великих кількостях в кістковому мозку, а також присутні в клітинах периферичної крові. За деякими даними, ГСК також можуть диференціюватися в клітини інших тканин, наприклад, м'язової. І, нарешті, в усіх органах присутні регіональні стовбурові клітини (РСК) – як правило, це вже досить диференційовані клітини і вони можуть дати початок лише кільком різновидам клітин, з яких складаються тканини даного органу.

МСК здатні перебудовуватись від хондробластів до кардіоміоцитів, у тому числі у міоцити та ендотеліальні клітини тощо. Серед гематогенного пулу стовбурових клітин найбільш поширений тип – це гемопоетичні (кровотворні) стовбурові клітини, що дають початок усім клітинам крові [153]. Гемопоетичні стовбурові клітини є справжніми організаторами регенерації тканин. Примітно те, що їх кількість не зменшується з віком. Лікування стовбуровими клітинами (MSK-терапія) прийнято вважати інноваційним методом, що заснований на ключовій їх особливості – недиференційованості (відсутності належності до будь-якої конкретної тканини). Отже, вони мають здатність ділитись та розвиватись в спеціалізовані клітини різних тканин. Сучасні експериментальні дослідження демонструють покращення регенерації нерва під дією недиференційованих та стовбурових клітин, диференційованих в нейрогліальному напрямку. Також відома дія факторів росту, які оптимізують раневий процес, знижують рівень запалення через активацію неоангіогенеза

покращення трофіки нервів та стимулюють міграцію стовбурових клітин у зону ушкодження [161]. Однак, стосовно поперечно-посмугованих м'язів кінцівок, зовсім відсутня інформація щодо можливих механізмів впливу клітинних технологій на їхні регенераторні можливості в умовах посттравматичної ішемії. Проте, на основі багатьох експериментальних даних [169] було встановлено, що чутливість тканин до ішемії різна. Так, толерантність м'язової тканини триває до 6 годин, нервової – до 12 годин, а шкіри – 24 години. Щодо головного та спинного мозку то вони в цілому та їхні окремі структурні утворення характеризуються підвищеною чутливістю до ішемії. Особливо чітко і переконливо це було продемонстровано на прикладі збільшення об'єму інфарктного ушкодження тканин головного мозку, що розвивалося на фоні гострої фокальної церебральної ішемії. Цей висновок був доведений даними прижиттєвих МРТ-досліджень мозку [104; 105], а також багаточисельних гістологічних, морфометричних та ультраструктурних патоморфологічних досліджень [41; 151].

Етіопатогенетичний механізм регенерації м'язової тканини при ішемії вивчені не до кінця. Elshaer із співавторами [66] вважають, що власне застосування стовбурових клітин може сприяти редукції некрозів у поперечно-посмугованих м'язах. Розглянемо це конкретне питання більш детально. В основі дії стовбурових клітин заходяться механізми мобілізації та хоумінга. Мобілізація проявляється у здатності стовбурових клітин мігрувати до ішемізованої ділянки, хоумінг означає здатність вертатись «додому», тобто у місце первинної дислокації. Визначальну роль у мобілізації віддають цитокінам (G-CSF, SCF, IL-3, Flt-3L, TPO). Мобілізація запускається завдяки молекулярним сигналам, в активації яких вирішальну роль відіграє тканинна гіпоксія, наприклад, для stromal cell derived factor-1 (SDF-1) [122]. Існує думка, що мобілізація та хоумінг є ланцюгом взаємопов'язаних дій, вона цікава з точки підвищення ефективності клітинної терапії зокрема під дією так званої PRP-терапії [116].

Абревіатура PRP — скорочення з англійського Platelet rich plasma, тобто плазма крові збагачена тромбоцитами [136]. Після формування згустку тромбоцити починають регулювати активність фібробластів, які у свою чергу виробляють колаген та еластин, тобто формується основа сполучної тканини. Під час PRP-терапії фактично імітується крововилив без фази запалення, що дозволяє тромбоцитам розпізнати пошкодження та звільнити фактори росту, які в свою чергу обумовлюють відправку організмом різних стовбурових клітин до місця пошкодження.

Збагачена тромбоцитами плазма отримується з крові пацієнта, шляхом центрифугування. Враховуючи те, що різні елементи крові мають різний розмір та вагу, після центрифугування у пробірці утворюються різні прошарки, зокрема ті де лишаються тільки тромбоцити. У нормі кількість тромбоцитів в плазмі крові становить $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$, після збагачення їхня кількість становить $1000\text{--}2500 \times 10^9/\text{л}$. У самих тромбоцитах α -гранули містять багато біологічно активних речовин – факторів росту [209].

Подальшим розвитком клітинних технологій є використання жирової тканини в поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою та аспірату кісткового мозку, як більш активних, порівняно зі збагаченою тромбоцитами плазмою джерелами факторів росту та стовбурових клітин. В цьому випадку введена жирова тканина діє як прокладка [162; 166].

Таким чином, вищевикладені положення зумовлюють наукову і практичну актуальність проблеми лікування пацієнтів з ішемічною контрактурою, що вимагає пошуку нових перспективних напрямків у вирішенні теоретичних (зокрема експериментальних) і практичних питань, пов'язаних з цією патологією.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота виконана відповідно до основних наукових напрямків НДР ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» «Дослідження

механізмів впливу клітинних технологій на ішемічні та денерваційно-реінерваційні процеси у м'язах (експериментально-клінічне дослідження)» № держреєстрації 0122U000306.

Мета дослідження: вивчити вплив тромбоцитарної плазми, клітинних аспіратів кісткового мозку та жирової тканини на структурні та біохімічні зміни у скелетних м'язах кінцівки дослідних тварин на тлі моделювання турнікетної ішемії кінцівки.

Завдання:

1. Шляхом експерименту дослідити розвиток структурних змін м'язової тканини на моделі турнікетної ішемії кінцівки у терміни 5, 15 та 30 діб.
2. Провести гістологічні та біохімічні дослідження м'язової тканини у реактивно-відновлювальному періоді ішемічної контрактури на основі яких дослідити вплив концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини регенеративні можливості ішемізованих м'язів.
3. Оцінити розвиток сполучної тканини у ділянках некрозів скелетних м'язів ішемізованої кінцівки сонографічним методом.
4. На основі гістологічних досліджень та електронної мікроскопії дослідити структурні зміни периферійних нервів кінцівки на тлі турнікетної ішемії кінцівок та під впливом концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини.
5. На основі біохімічних досліджень оцінити стан пероксидації та ферментативної антиоксидантної системи м'язової тканини у реактивно-відновлювальному періоді ішемічної контрактури під впливом концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату клітин кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини.

Об'єкт дослідження: ішемізовані м'язи та периферійні нерви кінцівки кролів внаслідок турнікетної ішемії.

Предмет дослідження: вплив клітинної терапії на структурні та біохімічні зміни в ішемізованих м'язах кінцівки кролів при турнікетній ішемії.

Методи дослідження: експериментальний (модифікація моделі гострої турнікетної ішемії кінцівки), ультразвукове дослідження (дослідження ентропії), гістологічний (дослідження структурних змін скелетних м'язів та нервів гомілки), електронно-мікроскопічний (дослідження ультраструктури м'язових волокон, мікросудин і нервів за норми та за різних термінів посттравматичної ішемії), морфометричний (кількісні вимірювання м'язових волокон – площа поперечного перерізу м'язових волокон, площа ядер м'язових волокон, кількість ядер на м'язове волокно; вимірювання відносного обсягу некрозів – відсоток і розташування некрозів; оцінка щільності нервових волокон великогомілкового нерва), біохімічний (дослідження змін окисно-відновного профілю та активності ферментативних систем антиоксидантного захисту скелетних м'язів гомілки за норми та за різних термінів посттравматичної ішемії), статистичний аналіз (непараметричні методи статистичної оцінки).

Наукова новизна роботи:

Вперше отримано наукові дані щодо впливу різних клітинних технологій на процеси регенерації ішемізованих скелетних м'язів внаслідок турнікетної ішемії кінцівок.

Поглиблено знання щодо якісних та кількісних характеристики структурних змін м'язової тканини у реактивно-відновлювальному періоді ішемічної контрактури під впливом клітинної терапії морфологічними та ультразвуковим методами досліджень.

Вперше в умовах експерименту проведено порівняльний аналіз впливу концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини на перебіг атрофічних процесів м'язової тканини в умовах посттравматичної ішемії кінцівок.

Виявлено деякі ефекти (формування нових міотубу, появу додаткових міомер) впливу аспірату кісткового мозку на перебіг процесу атрофії м'язової тканини і активації регенерації м'язових волокон у реактивно відновлювальному періоді ішемічної контрактури.

Вперше досліджено зміни периферійних нервів кінцівки за умов посттравматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Встановлено різницю щодо стійкості м'язової тканини і нервових стовбурів до посттравматичної ішемії, виявлено рівень збереження головних морфологічних структур нерва та топографічні особливості атрофії м'язів.

На основі сонографії (даних ентропії) встановлено ефективність ультразвукового дослідження у оцінці стану м'язової тканини, встановлено переваги методу на 5 добу після пошкодження кінцівки.

Вперше на основі експериментальних та біохімічних досліджень було досліджено стан пероксидації та ферментів антиоксидантної системи пошкоджених скелетних м'язів за умов введення у м'язову тканину концентрату тромбоцитарної плазми, аспірату кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Виявлено гіперпродукцією нітрит-аніону NO^{2-} у термін 5, 15 і 30 діб після турнікетної ішемії та позитивний ефект його зменшення після введення тромбоцитарної плазми і аспірату кісткового мозку, за рахунок відновлення глутатіонпероксидази як ферментативної ланки антиоксидантної системи, що вказує на відновні процеси у м'язовій тканині.

Практичне значення одержаних результатів. На основі отриманих даних розроблено та впроваджено в клінічну практику технологію введення суміші аспірату кісткового мозку та жирової тканини в ішемізовані ділянки скелетних м'язів в реактивно-відновлювальному періоді ішемічної контрактури.

Особистий внесок автора. Дисертація є особистою працею здобувача. Автором дисертаційної роботи особисто проведено аналіз сучасного стану

питання лікування постравматичної ішемії кінцівок на різних стадіях формування ішемічної контрактури. В експерименті досліджено вплив різних клітинних технологій на розвиток ішемії та процеси регенерації великогомілкового нерва, який проходить крізь ішемізований задній глибокий футляр гомілки, проведено їх порівняльну оцінку, а також вивчено вплив на денерваційні процеси у м'язах на ранніх стадіях регенерації та у віддаленому періоді. Отримані дані підтверджені за допомогою гістологічних та біохімічних досліджень. З урахуванням отриманих результатів розроблено та впроваджено в клінічну практику технологію введення суміші аспірату кісткового мозку та жирової тканини в ішемізовані ділянки скелетних м'язів.

Автор висловлює вдячність за допомогу у проведенні біохімічних досліджень к.б.н., с.н.с. Г.В. Косяковій та колегам Інституту біохімії НАН України, у проведенні гістологічних досліджень - к.б.н., доценту НМУ імені О.О.Богомольця С.І.Савоську, професору кафедри загальномедичних дисциплін та соціальної фармації, д.мед.н., професору М.О. Макаренку. Співпраця здійснювалась у межах договорів про наукове співробітництво.

Впровадження результатів дослідження. В практиці відділів «Мікрохірургії та реконструктивної хірургії верхньої кінцівки» та «Важкої поліструктурної травми» ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» застосовано використання суміші аспірату кісткового мозку та жирової тканини при реконструктивних втручаннях на периферійних нервах при компресійно-ішемічній нейропатії та при відновленні периферичних нервів у реактивно-відновному період ішемічної контрактури.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були висвітлені на Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Регенеративні технології в травматології та ортопедії» (м. Київ, 2021 рік), П'ята Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання лікування патології суглобів та ендопротезування» (м. Приморськ, 2021 рік), Міжнародна науково-практична

конференція 41ST SICOT ORTHOPAEDIC WORLD CONGRESS (м. Будапешт, Угорщина, 2021 рік), Науково-практична конференція з міжнародною участю «The 23rd EFORT Annual Congress» (м. Лісабон, Португалія, 2022 рік), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю. Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці» (Київ, 2023).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 наукових праць, з них індексуються у реферативній базі Scopus – 2 статті, Web of science – 1 стаття, у виданнях, включених до переліку наукових фахових видань ДАК МОН України – 3 статті, 4 тези в матеріалах з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена українською мовою на 178 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, 7 розділів, висновків. Ілюстрована 68 рисунками і 5 таблицями. Список літератури містить 225 джерел інформації (30 кирилицею та 195 латиницею). Дисертаційна робота виконана на базі відділення мікрохірургії та реконструктивно-відновної хірургії верхньої кінцівки та відділення важкої поліструктурної травми ДУ «Інституту травматології та ортопедії НАМН України».

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Історія вивчення посттравматичної ішемії розпочинається відтоді, коли німецький лікар Рихард Фолькман (Volkman R.) в 1869 році [29; 140; 206] повідомив про деформацію стопи в 16-річного хлопчика, яка виникла після запального процесу в колінному суглобі. В його подальших публікаціях він описав складну деформацію кисті під назвою “ішемічний параліч та контрактура м’язів” у пацієнтів з надвиростковими переломами плечової кістки. Рихард Фолькман вважав, що в основі формування цієї деформації знаходиться параліч м’язів, що виникає внаслідок порушення артеріального притоку, через що виникає їхня гіпоксія і вони перетворюються у рубець [201]. Найбільш сучасною та етіопатогенетично обґрунтованою назвою цих типових деформацій можна вважати ішемічну контрактуру кисті чи стопи. Вона виникає, як ускладнення після компартмент-синдрому.

За півторавікову історію дослідження посттравматичної ішемії було визначено багато патоморфологічних та патофізіологічних закономірностей її розвитку, чому сприяли численні експериментальні та клінічні дослідження.

Найперша експериментальна робота щодо вивчення патофізіології КС була виконана Е. Лехер [9]. На кролях та жабах було з’ясовано, що при створенні і турнікетної ішемії виникає некроз та фіброзне переродження м’язів. О. Hildebrand експериментально описав жирову дегенерацію та атрофію м’язів внаслідок перенесеної гострої ішемії. Він вперше висловив думку, що крім безпосереднього ураження м’язів, не менш важливим фактором у патогенезі розвитку ІК є ішемічне ушкодження нервів [10]. Його гіпотеза і до тепер панує у сучасній науковій думці, квінтесенцією якої є відсутність окремого ушкодження м’язів або нервів в умовах посттравматичної ішемії, і навпаки, ішемічне ушкодження м’язів і нервів є взаємопов’язаними процесами.

Перші впорядковані діагностичні та лікувальні заходи щодо ІК з'явилися тільки у 80-их роках минулого сторіччя, завдяки роботам S.J. Mubarak та T. Whitesides, які висунули теорію артеріо-венозних градієнтів. На підставі цих робіт прийшло розуміння, що ішемія це стадійний процес, який має свої клінічні ознаки залежно від патоморфологічних та патофізіологічних змін, що відбуваються в тканинах травмованої кінцівки в межах ушкоджених кістково-фасціальних футлярів [35].

З цих часів розрізняють безпосередньо компартмент-синдром, що виникає зразу після травми та триває протягом 3-х діб, гострий період ішемічної контрактури (до тижня від дня травми), реактивно-відновлювальний період ішемічної контрактури (від тижня з дня травми до 9 місяців) та резидуальний період ішемічної контрактури (від 9 місяців до кінця життя) [9]. При КС діагностують напружений набряк, почервоніння стопи, відсутність пульсу та збільшення підфасціального тиску [19]. Гострий період ішемічної контрактури характеризується набряком, лімфостазом, запальною реакцією, реактивно-відновлювальний період – це період некрозів, резидуальний період ІК – це період рубцевого переродження м'язів [23; 24]. Встановлена періодичність свідчить, що клінічна картина ішемічного ушкодження не є сталою, вона змінюється в часі, тому клінічні прояви ішемічної контрактури в кожний період ішемічного процесу є різними. Остаточну тяжкість ішемічного ушкодження можливо встановити тільки у резидуальному періоді [25].

Враховуючи зацікавленість у покращенні терапії ішемічно ушкоджених систем та органів, в останні 20 років ішемія дуже широко досліджується на клітинному та молекулярному рівнях. Особлива увага приділяється взаємозв'язкам функціонування систем організму в умовах ішемії. Для з'ясування цих питань активно вивчається надходження, розподіл та утилізація в м'язах O_2 , окислення та відтік метаболітів в умовах ішемії тощо [52; 101]. Доведено, що на початку компартмент синдрому анаеробний гліколіз є

адаптивним механізмом саморегуляції, який дає можливість клітинам тимчасово виживати в разі обмеженого постачання O_2 . У подальшому в ішемізованій тканині у великій кількості активуються ферменти, які збільшують проникність клітинних мембран. Так, діставшись до цитоплазми, вільний Ca^{2+} починає активувати ферменти, що перетворюють ксантіндегідрогеназу на ксантиноксидазу з вивільненням гіпоксантина. Ксантіндегідрогеназа утворюється в разі розпаду аденінових нуклеотидів, які руйнуються, щоб протистояти енергетичному голодуванню клітин. Під час цього процесу вивільнюється O_2 , який приєднується до високоенергетичних продуктів розпаду фосфатів завдяки гіпоксантину. У подальшому, в процесі оксигеназних реакцій утворюються активні форми O_2 : супероксидний радикал (O_2^-), гідроксильний радикал (OH^-), перекис водню (H_2O_2). Ці сполуки взаємодіють із ліпідами, білками, нуклеїновими кислотами, через що утворюються їх перекиси та активні радикали.

Повертаючись до стадійності ішемічного ушкодження м'язів, R. Rowlands в експерименті чітко розрізнув стадії інфільтрації, запалення та некрозу, які закінчувалися його рубцевим переродженням. Також він висунув гіпотезу, згідно якої ішемічне ушкодження м'язів може прогресувати після відновлення притоку до них крові [224]. Щодо патогенетичного значення м'язових некрозів у процесі формування ішемічної контрактури, слід зазначити, що провідна заслуга у вивченні цього питання належить J. Murphy. Він провів дослідження на собаках та довів, що при уламкових переломах кісток, за рахунок масивного крововиливу, відбувається підйом ПФТ. Збільшення ПФТ призводить до перекриття кровопостачання м'язів, що є причиною їх некрозу та рубцевого переродження [186].

P. Jerson [98] під час тривалого спостереження за тваринами, що перенесли гостру ішемію кінцівок, описав характерну деформацію тазової кінцівки собаки за типом «пташиної лапки» внаслідок розвитку ішемічної контрактури, яка

виникала в строки від 6 днів до 18 міс після турнікетної ішемії. Саме він вперше висунув гіпотезу про подальше перетворення некрозу у фіброз і формування за рахунок останнього такої характерної постави кінцівки [84]. Поряд із цим, у 1936 році Jerson встановив лікувальний ефект фасціотомії. Було встановлено, що після проведеної операції в першу добу після компартмент синдрому деформації кінцівок тварин за типом «пташиної лапки» не спостерігалось [102].

Розвитку артеріальної теорії виникнення ішемічних ускладнень при травмах кінцівок сприяла Друга світова війна. Концептуальним положенням цієї теорії було те, що при травмі магістральних судин провідним фактором виникнення ішемії м'язів є артеріальний спазм. Спазм судин спостерігали при подразненні артеріальної стінки відламками кісток та бойових набоїв, що зменшувало артеріальний приток до м'язів кістково-фасціальних футлярів. У контексті артеріальної теорії було визначено клінічну симптоматику початку компартмент-синдрому як чотири P: pain (біль); painless (зниження чутливості); pallor (блідість); pulselessness (відсутність пульсу) [126]. Проте ґрунтовні експериментальні роботи що етіопатогенетично описували б зазначену клінічну картин з'явилися тільки у 70-х роках минулого сторіччя. Так у 1977 році F. Matsen [131] на основі експериментальних досліджень запропонував теорію змін артеріовенозних градієнтів для пояснення патогенезу КС. Згідно цієї теорії, підвищення ПФТ призводить до зростання місцевого венозного тиску, що викликає зниження місцевого артеріовенозного градієнта. Поступово відбувається уповільнення кровотоку в капілярах, що призводить до зниження метаболічних процесів між кров'ю та оточуючими тканинами [115].

Теорія артеріовенозного градієнта переконливо пояснює механізм зменшення кровотоку в тканинах при підвищенні ПФТ, а також збереження дистальнішої зони ішемічного некрозу циркуляції крові, яка забезпечує життєдіяльність власних м'язів кисті при ішемічному некрозі м'язів передпліччя. Ця теорія достатньо чітко прогнозує ефективність декомпресійної фасціотомії,

яка перш за все призводить до пониження місцевого венозного тиску, збільшення артеріовенозного градієнта, покращання кровопостачання тканин.

З початку ХХ сторіччя відомо, що патоморфологічним субстратом реактивно-відновлювального періоду є утворення Цанкеровського некрозу в ішемізованих м'язах. Тому всі лікувальні заходи зводяться до видалення некротизованих тканин та боротьби з утворенням контрактури.

У реактивно-відновлювальному періоді при формуванні некрозів у м'язах-згиначах кисті та пальців, кисть набуває стійкої долоної флексії, передпліччя – положення пронації [13]. Потім з'являється контрактура пальців, найбільш уражуються глибокі згиначі пальців кисті, що обумовлює характерну установку, а саме перерозгинання в п'ястно-фалангових суглобах (ПФС) і згинання в міжфалангових суглобах (МФС) пальців кисті. Кисть набуває вигляду пазуристої лапи [69]. При долонному згинанні кисті деформація зменшується, а при розгинанні, навпаки, збільшується. Цей симптом отримав назву позитивного рухового феномену [41]. На нижній кінцівці теж уражаються переважно згиначі, внаслідок чого стопа встановлюється в положенні підошовного згинання. При спробі розгинання виникає різкий біль [222]. Однак, більшість авторів вказують, що порушення чутливості і контрактура є пізніми симптомами, що свідчать про незворотні зміни м'язових волокон [187].

Не вирішеною проблемою є лікування пацієнтів у реактивно-відновлювальному періоді ІК. Аналіз літературних даних останніх 10 років виявив, що у світі панує пасивна лікувальна тактика або тактика спостереження на протязі 9-18 місяців реактивно-відновлювального періоду ІК. Згідно даних сучасної літератури основними, так би мовити класичними лікувальними заходами, у цьому періоді є консервативна терапія, починаючи від антиоксидантної та вітамінотерапії до ЛФК масажу. Сучасне консервативне лікування ІК є комплексним. Воно складається з медикаментозного, фізіотерапевтичного і функціонального компонентів [32; 40]. Широко

використовують препарати, які поліпшують синтез фосфоліпідів і мембран клітин, сприяють синтезу макроергічних фосфатів (ніколете, дибазол, метіонін, прозерин, вітаміни групи В тощо) [137].

Останнім часом широко використовують аденозин, його терапевтичний ефект пов'язаний із стимуляцією ангиогенезу. Він діє як вазодилататор, дає антитромбоцитарний та антинейтрофільний ефект, справляє регулюючий вплив на метаболізм кисню [141].

Аналіз літературних даних показує зростання рівня зацікавленості фахівців в різних медичних галузях щодо дослідження можливих фізіологічних механізмів покращення регенераторних можливостей ішемізованих тканин, зокрема м'язів серця та головного мозку [190]. Вище було підкреслено, що у цьому аспекті найбільш перспективним та сучасним напрямком є клітинна терапія із застосуванням стовбурових клітин. Ще у 60-тих роках ХХ століття були перші спроби виділити стовбурові клітини з жирової тканини – вони були здійснені J. Rodbell та F. Jones [33]. Однак стримкий розвиток цього напрямку розпочався тільки у 1998 році, після публікації статті F.H. Gage в журналі «Nature» [46], та одночасно публікації статті групою авторів з Вінконсїського університету, на чолі з Джеймсом Томпсоном - у журналі «Science» було опубліковано дві статті: «Ембріональні стовбурові клітини, що виділені з бластоцистів людини», «Новий потенціал людських ембріональних стовбурових клітин». Починаючи з цих публікацій, настав новий вирішальний етап застосування клітинної терапії у лікуванні багатьох захворювань – зокрема таких як ішемічна хвороба серця, дитячий церебральний параліч, інсульт головного мозку тощо [33].

Велику цікавість серед науковців викликає можливість використання ембріональних стовбурових клітин. Вони виділяються на стадії бластоцисти, та мають властивість до диференціювання як в умовах *in vitro*, так і *in vivo*. Проте застосування цієї методики у практиці пов'язане не тільки з проблемами етики

використання ембріональних клітин людини, але й великою вірогідністю розвитку злоякісних новоутворень у тілі реципієнта, що було доведено в експериментах [89; 211].

S.P. Frey (2012) [71] уперше описав позитивний ефект від застосування hSM-MSC-людських мезенхімальних синовіальних клітин на некротизованих ділянках ішемізованих м'язів. На волонтерах випробувано ефект генної інженерії. Використовували терапевтичний ефект VEGF при генній терапії ішемізованої кінцівки в реактивно-відновлювальний період. Проникнення в клітини, які потенціально могли некротизуватися, здійснювали за допомогою аденовірусів, що кодовані VEGF чинником та β -галактозидазою. Вже на 3-тю добу спостерігали інверсію «мозаїчних» некрозів у *m. tibialis posterior*.

Враховуючи те, що клонування та диференціація клітин є довготривалим і вартісним процесом, в ортопедичній практиці найбільш широко застосовуються клітини, що отримані з жирової тканини, кісткового мозку та плазми крові. Отриманні з цих тканин стовбурові клітини можна охарактеризувати як «будівельників» організму, що активують регенераторні можливості ушкоджених тканин; до того ж вони запускають протизапальні процеси, а також беруть участь у формуванні нових кровоносних судин (неоангіогенез). На Всесвітній конференції, присвяченій дії стовбурових клітин у Нью Йорку (2006), був прийнятий консенсус щодо доказовості терапевтичної дії стовбурових клітин, а саме: можливість трансформації у інші клітини; міграція до ушкоджених тканин організму; приживання у ушкоджених тканинах і органах та відновлення функції цих тканин та органів [33].

Серед фізіотерапевтичних заходів широко застосовують електрофорез йоду калію, електростимуляцію м'язів, парафінові аплікації тощо. Проте їх застосування дає місцевий ефект, що не може зупинити розвиток некрозів.

Аналіз даних літератури виявив, що не існує такої ж ортопедичної патології, як ішемічна контрактура, при лікуванні якої застосовувався такий

великий спектр лікувальних заходів, починаючи від накладання етапних гіпсових пов'язок і закінчуючи мікрохірургічною пересадкою складних комплексів тканин. Однак, застосування такої широкої низки лікувальних засобів у реактивно-відновлювальному періоді ІК різко обмежене.

Першими консервативними лікувальними заходами цього періоду можна вважати етапне шинування кисті, яке застосовував В. Bardenheuer [67]. Він писав, що етапне шинування спрямоване на гальмування дегенеративно-дистрофічних процесів і відновлення структури і функції нервово-м'язових утворень ішемізованого передпліччя. Але С.Л. Трегубов [97] під час Вітчизняної війни вказував, що застосування етапного шинування в 62 ішемізованих хворих з ураженнями кінцівок після вогнепальних поранень сприяло відновленню функції та зникненню больового синдрому тільки в 25%. Поряд із цим, у 12 % пацієнтів спостерігали розвиток гангрени та некрозів м'язів дистальних сегментів, що закінчувалося ампутацією [97]. З 50-х років минулого сторіччя почали використовувати шарнірні дистракційні зовнішні апарати у вигляді рукавиць, чобітків, які дозволяли проводити дистракцію і поступове виведення суглобів з патологічних установок [68]. Однак, С. Bartlett [194] писав, що широко розповсюджена методика етапної дистракції з лікувальним масажем у пацієнтів з ІКС призводить до розвитку компресійно-ішемічної нейропатії *n. tibialis*, поглиблення больового синдрому та трофічних розладів. Поряд із цим багатьма авторами відмічено позитивний ефект функціональної терапії у вигляді масажу, лікувальної фізкультури (ЛФК), вправ на апаратах, застосування функціональних шин [53].

Оперативне лікування у цьому періоді ІК обмежене. У 1974 році В. В. Кованов вважав, що відновлення кровотоку в цій стадії у багатьох випадках призводить до відновлення м'язової тканини, що, у свою чергу, сприяє відновленню функцій кінцівки, проте лікування компресійно-ішемічних нейропатій вимагає тривалого лікування, яке в багатьох випадках є

малоефективним [97]. Однак, чимало авторів пишуть, що результати відновлення рухової функції м'язів та зменшення чутливих порушень на кисті чи стопі є кращими у хворих, яким відновлення нервів виконано саме в реактивно-відновлювальному періоді ІК [76]. Першим активну хірургічну тактику при лікуванні периферичних нервів застосував Н.С. Seddon [44]. Саме він зробив перші операції із звільнення нервів передпліччя від некротизованих та фіброзованих тканин, що спричиняли їх стиснення. Тобто його операції були прообразом сучасного невролізу.

У рамках активних хірургічних заходів у разі компресійно-ішемічної нейропатії периферичних нервів виконують їх відновлення (шов, пластика) (у разі ушкодження) та невроліз (у разі стиснення рубцями, що формуються на місці некрозів). Проте незважаючи на значні досягнення оперативної хірургії нервів і судин кінцівок, що ґрунтуються на застосуванні різноманітних мікрохірургічних технік, результати операцій на нервах в умовах ішемії у багатьох пацієнтів залишаються незадовільними [196]. Таким чином, начебто, можна поставити крапку і спостерігати, як поступово формуються контрактури та вадні установки кисті чи стопи, а потім у резидуальному періоді ІК застосовувати активну оперативну тактику (артродезування, сухожилко-м'язові транспозиції тощо) [90]. Однак лишається низка питань, що потребують подальшого дослідження і вивчення, у аспекті можливого терапевтичного впливу на некрози, їхню редукцію і, тим самим, профілактику подальшого формування контрактур кисті чи стопи.

Надзвичайно важливим завданням є можливий терапевтичний вплив на некрози, їхню редукцію і тим самим, профілактика подальшого формування контрактур кисті чи стопи.

Вкрай важливою задачею в лікуванні ІК вважається своєчасне лікування ішемічних уражень нервових стовбурів. У патогенезі нейропатії нервових стовбурів при ішемії відіграють роль два фактори: безпосереднє ураження

нервового волокна при підвищеному ПФТ при КС та вторинна компресія фіброзованими тканинами при формуванні ІК [127; 139].

З 80-х років минулого сторіччя відмічається велика кількість позитивних результатів лікування периферичних нервів в умовах ішемії, що пов'язано з бурхливим розвитком мікрохірургічної техніки. Так, виконання ендоневролізу під мікроскопічним збільшенням дозволило значно покращити результати оперативного лікування пацієнтів з ІКК [128]. У 71% випадків відновилась чутливість в автономній ділянці іннервації серединного нерва, у 61% - покращилась трофіка ішемізованої кисті, загоїлись трофічні виразки. У публікаціях автори доходять висновку про необхідність раннього (до 3 міс від початку розвитку КС) відновлення цілісності периферичних нервів, що є профілактикою формування тяжкої ІК у резидуальному періоді [198; 205; 210].

Застосування пластики периферичних нервів навіть при великих дефектах (понад 6 см) дозволяє покращити захисну чутливість та трофіку кисті [34]. Великі сподівання ортопеди-травматологи покладали на використання мікрохірургії в 90-их роках минулого століття при операціях на судинах, у тому числі, і при пересадці складних комплексів тканин. Мікрохірургія начебто відкрила нові можливості у лікуванні ІК у реактивно-відновлювальному періоді, однак часті тромбози анастомозів зводили нанівець старання хірургів [21; 60]. За даними літератури, у реактивно-відновлювальному періоді ІК існувало багато спроб ранньої реконструкції [76]. Однак, застосування транспозицій м'язів з метою відновлення функції кисті чи стопи потерпіло крах навіть з використанням антибіотиків. Так, R.K. Caldwell [31] вказував на нагноєння після транспозиції *m. tibialis posterior* на стопі у 45% випадках у пацієнтів з ішемічною контрактурою стопи (ІКС). Саме загроза нагноєння на ґрунті некрозів стає перепорою для застосуванні реконструктивних втручань в реактивно-відновлювальному періоді ІК. Крім того, некротизуються не тільки м'язи, але й судини та нерви, що

призводить до розвитку нейротрофічного синдрому ушкодженого сегмента, що є суттєвим обтяжуючим фактором в лікуванні цих хворих [70].

Саме невдалі хірургічного відновлення функції кінцівок у реактивно-відновлювальному періоді ішемічної контрактури змусило віднайти нові засоби протистоянню розвитку незворотніх некрозів, зокрема можливості застосування клітинної терапії. Згідно визначення Всесвітньої організації охорони здоров'я, клітинна терапія являє собою, новий напрямок, де для лікування застосовуються живі клітини різного походження, які у організмі пацієнта здатні активно функціонувати, результатом чого є покращення або модифікація функції органу або тканини та відновлення чи заміна втраченої функції.

У людини налічується всього понад 220 видів різних клітин. Стовбурові клітини дорослої людини можна поділити на три основні групи: гемопоетичні (кровотворні) (ГСК), мультипотентні мезенхімальні (стромальні) та тканиноспецифічні клітини-попередниці.

Серед гематогенного пулу стовбурових клітин найбільш поширений тип – це гемопоетичні (кровотворні) стовбурові клітини, що дають початок усім клітинам крові [117; 171]. Гемопоетичні стовбурові клітини є справжніми організаторами регенерації тканин. Примітно те, що їх кількість не зменшується з віком.

Найбільш універсальними з стовбурових клітин є мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) - вони виявлені в кістковому мозку, жировій тканині і в незначних кількостях в інших тканинах. Ці клітини можуть давати початок різноманітним клітинам кісткової, хрящової, м'язової і, можливо, деяких інших тканин, вони здатні перебудовуватись від хондробластів до кардіоміоцитів, у тому числі у міоцити та ендотеліальні клітини тощо. При цьому стовбурові клітини зберігаються у депо та продовжують виконувати свої функції і в дорослому організмі.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) – це клітини мезодермального походження, що формують різні тканини у всьому організмі та дають початок фібробластам, остеобластам, хондроцитам, адипоцитам та ендотеліоцитам [181]. Джерелами мезенхімальних стовбурових клітин можуть бути: строма кісткового мозку, жирова тканина, пульпа зуба, пуповинна кров, амніотична рідина, мигдалини, та ін. [221]. Вибір таких джерел мезенхімальних стовбурових клітин як кістковий мозок чи підшкірна жирова клітковина пов'язаний з доступністю їх отримання та можливістю аутологічних пересадок [118]. Окрім цього, вони мають імуномодулюючі властивості, виробляють протизапальні цитокіни та антиапоптичні молекули. Аналіз молекулярних механізмів взаємовідношень мезенхімальних стовбурових клітин та імунокомпетентних клітин показав, що введення МСК призводить до пригнічення функції Т- та В-лімфоцитів та інгібування дозрівання дендритних клітин. В дослідях *in vitro* доведено, що МСК, виділені з кісткового мозку, жирової тканини чи пупочного канатика, відрізняються за здатністю модулювати продукцію імуноглобулінів в клітинах В-лімфоїдного ряду. Встановлено також, що МСК з різних джерел відрізняються різною пластичністю, нейрогенним потенціалом, та паракринною активністю [171].

За допомогою них відбувається оновлення тканин організму та їх відновлення, а отже, стовбурові клітини можуть бути виділені у людей різного віку. Механізм відновної дії стовбурових клітин пояснюють їх здатністю диференціюватись в різні клітини і таким чином відновлювати пошкоджені органи та за допомогою продукції різноманітних факторів впливати на функціональну активність інших клітин. Лікування стовбуровими клітинами (МСК-терапія) прийнято вважати інноваційним методом, що заснований на ключовій їх особливості – недиференційованості (неналежності до будь-якої конкретної тканини). Отже, вони мають здатність ділитись та розвиватись в спеціалізовані клітини різних тканин. В залежності від захворювання, віку та

стану пацієнта, кращим може бути те чи інше джерело стовбурових клітин. Також, у всіх органах присутні регіональні стовбурові клітини - як правило, це вже досить диференційовані клітини і вони можуть дати початок лише кільком різновидам клітин, з яких складаються тканини даного органу.

Щодо стовбурових клітин жирової тканини (СКЖТ) (Adipose Derived Stem Cells (ADSCs)), то у сучасних публікаціях їх часто називають стромально-васкулярною фракцією, яка складається з клітин крові, ендотеліоцитів, перицитів та інших судинних клітин, а також з клітин, що розташовуються уздовж капілярів - їх називають стромальними стовбуровими клітинами [45]. Такий тип стовбурових клітин виділяють шляхом дисоціації жирової тканини, отриманої внаслідок ліпосакції чи хірургічного видалення жирових відкладень, за допомогою колагенази та еластази. В спеціально підібраних умовах стовбурові клітини жирової тканини здатні до трансформації на нейрони, астроцити, остеобласти, клітини міогенного типу та інші [119]. Особливістю СКЖТ є їх висока пластичність [119].

Також відмічено позитивний вплив СКЖТ на ангиогенез у нерві [170]. Сучасні експериментальні дослідження показують покращення регенерації нерва під дією недиференційованих та стовбурових клітин, диференційованих в нейрогліальному напрямку. Окрім того деякі автори вказують, що застосування стовбурових клітин жирової тканини значно зменшує фіброзування травмованих ділянок, сприяючи утворенню більш еластичних рубців [117].

Поряд із цим, існує низка робіт, в котрих доведено несприятливу дію таких чинників, як гіпоксія, окислювання та запалення (тобто патологічних процесів що відбуваються при ішемічному ушкодженні тканин), а саме таких що призводять до загибелі до 70 % трансплантованих СКЖТ [167]. Тому з метою подовження періоду виживання їх використовують разом зі збагаченою тромбоцитами плазмою (PRP). Аббревіатура PRP — скорочення з англійської Platelet rich plasma, тобто плазма крові, збагачена тромбоцитами [136]. Наприкінці минулого сторіччя

стало відомо, що тромбоцити — не просто матеріал для «корки», що забезпечує витікання крові. Після того, як згусток сформовано, речовини що виділяють тромбоцити починають регулювати активність фібробластів, які у свою чергу виробляють колаген та еластин - тобто формується основа сполучної тканини.

Збагачена тромбоцитами плазма отримується з крові пацієнта, шляхом центрифугування. Враховуючи те, що різні елементи крові мають різний розмір та вагу, після центрифугування у пробірці утворюються різні прошарки, зокрема ті де лишаються тільки тромбоцити. У нормі кількість тромбоцитів в плазмі крові становить $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$, після збагачення їхня кількість становить $1000\text{--}2500 \times 10^9/\text{л}$. У самих тромбоцитах α -гранули містять багато біологічно активних речовин – факторів росту [203]. Під час PRP-терапії, фактично імітується крововилив без фази запалення, що дозволяє тромбоцитам розпізнати пошкодження та звільнити фактори росту, які в свою чергу забезпечують відправку організмом різних стовбурових клітин до місця пошкодження. Проведені експериментальні дослідження свідчать, що використання комбінації СКЖТ та PRP при інфаркті міокарда дозволяє збільшити виживаємость клітин у 90% і більше відсотків [193].

На теперішній час вже відомо, що фактори росту впливають на оптимізацію раневого процесу, шляхом зниження рівня запалення через активацію ангиогенезу [138]. Як вже було підкреслено вище, в основі дії стовбурових клітин лежать механізми мобілізації та хоумінга. Мобілізацію можна спостерігати у здатності стовбурових клітин до міграції до ішемізованої ділянки, в той час як маніфестація хоумінгу полягає у здатності вертатись «додому», тобто у місце первинної дислокації. Прийнято вважати, що у мобілізації визначальна роль належить цитокінам (G-CSF, SCF, IL-3, Flt-3L, TPO). Мобілізація запускається завдяки молекулярним сигналам. У свою чергу, в активації яких вирішальну роль відіграє тканинна гіпоксія, наприклад, для stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) [122]. Існує думка про те, що мобілізація та хоумінг являють

собою ланцюг взаємопов'язаних дій, а мобілізація цікава ще й з точки зору підвищення ефективності клітинної терапії, зокрема під дією PRP-терапії [116].

Поряд із цим, у доступній науковій літературі ми не знайшли посилань щодо можливого впливу клітинних технологій на поперечно-посмуговані м'язи кінцівок в умовах посттравматичної ішемії. Однак завдяки використанню електронної мікроскопії виявлено стадійність ішемічної загибелі клітин [191]. Так, через 4 години теплової ішемії з'являється набряк та відбувається вакуолізація мітохондрій, розрив їхніх мембран, гомогенізація та фрагментація крист. На 5-й – 6-й годині руйнуються лізосоми та зливаються рибосоми. Через 8 годин спостерігається зморщування та руйнація ядра. Для 12 годин від епізоду ішемії характерні незворотні явища у вигляді аутолізу клітин, поширення некрозів та втрати повної архітектоніки м'язового волокна. Чутливість тканин до ішемії різна – так, толерантність м'язової тканини триває до 6 годин, нервової – до 12 годин, а шкіри – 24 години.

Щодо головного та спинного мозку, то вони в цілому та їхні окремі структурні утворення характеризуються підвищеною чутливістю до ішемії. Особливо чітко і переконливо це було продемонстровано на прикладі збільшення об'єму інфарктного ушкодження тканин головного мозку, що розвивалося на фоні гострої фокальної церебральної ішемії. Цей висновок був доведений даними прижиттєвих МРТ-досліджень мозку [104; 105], а також багаточисельних гістологічних, морфометричних та ультраструктурних патоморфологічних досліджень [121]. Саме завдяки результатам цих та попередніх досліджень була розроблена і успішно використовується концепція так званого «терапевтичного вікна», метою якої є запобігання розширення (розповсюдження) ділянки ураження мозку при гострому ішемічному інсульті [95].

Якщо екстраполювати концепцію «терапевтичного вікна» на м'язи, то клітинна терапія повинна перш за все діяти на наслідки закритого стану ішемізованої кінцівки. Він характеризується тріадою при дії ішемічного фактору,

до якої відносять перекриття доставки в м'яз O_2 , субстратів окислення та відтік метаболітів. Зміни трансмембранного розподілу, внутрішньоклітинного вмісту та співвідношення різних іонів розвиваються внаслідок зниження енергетичного обміну й поєднуються із одночасним ушкодженням мембран та ферментів.

Дисбаланс іонів проявляється накопиченням у клітині Na^+ та втратою K^+ через порушення роботи K^+/Na^+ -залежної-АТФ-ази, що знаходиться у плазмолемі. Також зростає вміст Ca^{2+} при посиленні конкуренції з Na^+ за загальний трансмембранний білок-переносник, який входить до складу Na^+/Ca^{2+} -іонообмінного механізму й забезпечує обмін двох іонів Na^+ , що йдуть у клітину, на один іон Ca^{2+} , що виходить з неї. Зміни трансмембранного розподілу катіонів призводять до збільшення у клітині вмісту аніонів Cl^- , HCO_3^- і т.ін. Порушення внутрішньоклітинного вмісту іонів обумовлює зміни об'єму міоцитів через дисбаланс рідини, їхню гіпергідратацію та розвиток внутрішньоклітинного набряку. Збільшення вмісту іонів Na^+ та Ca^{2+} у пошкоджених міоцитах призводить до підвищення осмотичного тиску та накопичення води, оскільки відбувається руйнація плазмолемі, мембран субклітинних утворень та зниження рН. Через закислення внутрішньоклітинного середовища знижується осмотичний тиск, клітини зморщуються та гинуть.

Ознакою того, що клітина гине є порушення процесів її енергетичного забезпечення на етапах синтезу, транспортування та утилізації АТФ. Уповільнення тканинного обміну ініціює локальні та системні ушкодження при швидкій утилізації O_2 та перехід м'язової тканини на анаеробний гліколіз із накопиченням великої кількості недоокислених продуктів розпаду. Цей патогенетичний ланцюг призводить до незворотної загибелі м'язів, яка за даними Р.А. McNulty (1989) [88] відбувається за 6–9 год ішемії. Якщо на протязі цього терміну не відбувається розрив тріади в зоні ішемічного ураження, починаються некрози та формується у подальшому ішемічна контрактура кінцівок.

Етіопатогенетичний механізм розвитку некрозів у реактивно-відновлювальному періоді ІК досить повно розкритий у науковій літературі, проте механізми можливої їхньої редукції не вивчені. Хоча деякі автори [156] вважають, що саме застосування стовбурових клітин може сприяти редукції некрозів у поперечно-посмугованих м'язах. Поряд із тим існує не одна сотня публікації де детально описані клітинні методики при лікуванні ішемічного ушкодження серцевого м'яза та при ішемічному інсульті головного мозку.

Таким чином, вищевикладені положення зумовлюють наукову і практичну актуальність проблеми, що пов'язана з лікуванням пацієнтів з ішемічною контрактурою; це вимагає пошуку нових перспективних напрямків у вирішенні теоретичних (зокрема експериментальних) і практичних питань цієї надважкої патології.

Отже, у результаті аналізу наукових джерел літератури щодо можливостей застосування клітинних технологій у разі посттравматичної ішемії кінцівок з'явилась низка питань, які потребують подальшого вирішення:

- Відсутність будь яких посилань щодо можливостей застосування клітинних технологій з метою редукції некрозів ішемізованих м'язів, що виникли після перенесеного компартмент синдрому.

- Відсутні данні щодо розвитку некрозів (розповсюдженість, редукція) м'язової тканини та нервів у реактивно-відновлювальному період ішемічної контрактури під впливом клітинної терапії. Для вирішення цього питання доцільно провести ґрунтовні гістологічні дослідження, які дозволять оцінити якісні та кількісні характеристики м'язової тканини у реактивно-відновлювальному періоді ішемічної контрактури під впливом клітинної терапії.

- Виникає зацікавленість у дослідженні дистрофічних змін поперечно-посмугованих м'язів у разі посттравматичної ішемії під впливом клітинної терапії. Аналіз слід проводити на основі гістологічних та біохімічних змін, у тому числі із застосуванням світлової та електронної мікроскопії.

- У контексті зазначеної проблеми виникає потреба у поглибленні знань щодо дистрофічних (дегенеративних) процесів у нервах гомілки після перенесеної посттравматичної ішемії та впливу тканинної терапії.

Наявність цих невирішених питань обумовила постановку завдань цієї експериментальної роботи.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Методика проведення експерименту

Матеріалами дисертаційного дослідження були результати експериментів з моделювання посттравматичної ішемії кінцівки та вивчення впливу клітинних технологій. Експерименти проведені на кролях (порода Шиншила) вагою 4,2-4,5 кг. Кролів утримували в умовах клініки для експериментальних тварин на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі та води. Премедикацію та знеболення дослідних тварин здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (і.р., 60 мг/кг). Експериментальні маніпуляції проводили відповідно до правил “Regulations on the animal use in biomedical research”, “European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes”, “Guide for the care and use of laboratory animals”(Страсбург 1986 р).

Модель експерименту полягала у моделюванні механічної ішемії кінцівки. Для цього на ліву задню кінцівку накладали медичний еластичний джгут (ширина джгута 5,5 см) тривалістю 6 годин. Вимірювання підфасціального тиску проводили у задньому глибокому футлярі гомілки за класичною інвазивною методикою Whitesides із застосуванням серійного приладу «Stryker Intra-Compartmental Pressure Monitor» (США) для одноразового визначення показників при кожному вимірюванні та сонографічним контролем (див. рис. 2.1). При показниках підфасціального тиску понад 10 мм рт. ст. (за рекомендаціями Харгеса (1964 р.) на першому часі експерименту і понад 30 мм рт. ст. вважали, що компартмент синдром у кістково-фасціальних футлярах гомілки відбувся.



Рисунок 2.1 – Фото. Методика вимірювання підфасціального тиску у задньому глибокому футлярі гомілки. 1-накладання джгута на кінцівку кроля; 2-одноразове вимірювання підфасціального тиску за допомогою стандартизованого пристрою.

Після зняття джгута та контролю ПФТ тваринам вводили клітинні препарати у задній глибокий футляр гомілки, як вказано у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Розподіл дослідних тварин на групи

№	Група	Термін спостереження / кількість тварин			Всього	Хірургічні втручання та маніпуляції
		5 доба	15 доба	30 доба		
1	2	3	4	5	6	7
1	Інтактний контроль *	5			5	тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту
2	Ішемія	5	5	5	15	тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, моделювання ішемії кінцівки, для виведення тварин з експерименту

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5	6	7
3	Ішемія + концентрат тромбоцитарної плазми	5	5	5	15	тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, моделювання ішемії кінцівки, введення у задній глибокий футляр гомілки концентрату тромбоцитарної плазми, тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту
4	Ішемія + аспірат кісткового мозку	5	5	5	15	тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, моделювання ішемії кінцівки, введення у задній глибокий футляр гомілки аспірату клітин кісткового мозку, тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту
5	Ішемія + аспірат жирової тканини	5	5	5	15	тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, моделювання ішемії кінцівки, введення у задній глибокий футляр гомілки гомогенізованої жирової тканини, тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту

Примітка - * одноразове дослідження

Інтактна контрольна група – 5 кролів яким виконувалось одноразове дослідження в один термін. Включення інтактної групи було у експеримент було по'язано з отриманням початкових сонографічних, гістоморфологічних

показників та проведенням біохімічного дослідження серед експериментальної серії всіх тварин що використовувались у експерименті. Особливе значення надавали отриманню первинних біохімічних показників. Відомо, що усі біохімічні показники характеризують окисну модифікацію білків та ліпідів у пошкоджених тканинах і механізми боротьби з цим. Ми спробували встановити, а чи має позитивний ефект "лікування" при застосуванні клітинних субстратів на ці процеси? Для цього ми результати після лікування порівнювали з контрольною інтактною групою.

Таким чином, крім інтактної контрольної групи у нас утворилось 4 експериментальні групи:

- 1) основна група (n=15) з ішемією;
- 2) група з ішемією та ін'єкцією концентрату тромбоцитарної плазми (n=15);
- 3) група з ішемією та ін'єкцією аспірату кісткового мозку у м'язи гомілки (n=15);
- 4) група з ішемією та ін'єкцією жирової тканини (n=15).

Методики отримання клітинних препаратів що вводились тваринам у експерименті надаємо далі за текстом.

Методика одержання концентрату тромбоцитарної плазми. Здійснювали аспірацію крові з ушної вени кроля у кількості 5 мл. Отриману кров поміщали у спеціальну пробірку фірми Artrex для отримання концентрату тромбоцитарної маси, після чого проводили центрифугування при 760 g протягом 8 хвилин. Отриманий концентрат евакуювали у 5 мл шприц, після чого здійснювали введення останнього у задній глибокій футляр гомілки, як показано на рис 2.2.



Рисунок 2.2 – Фото. Методика одержання та введення концентрату тромбоцитарної плазми у ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки кроля під сонографічним контролем. 1 - аспірація крові з вушної вени; 2 - центрифугування крові з метою отримання концентрату тромбоцитарної плазми; 3 – введення концентрату тромбоцитарної плазми у ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки під сонографічним контролем.

Методика одержання суспензії клітин аспірату кісткового мозку

Аутологічний аспірат кісткового мозку отримували з проксимального відділу стегна кроликів. Кістковий троакар (діаметр 10G) вводили у проксимальний відділ стегна кролика, шприцом 5 мл виконували аспірацію кісткового мозку в об'ємі 5 мл. Аспірат сепарували через фільтр Tulip Emulsifier™ (Tulip Medical Products, USA). До аспірату додавали антикоагулянт цитрат декстрази АЦД-А (Baxter S.A., Belgium). Отриманий аспірат центрифугували при 760 g протягом 8 хвилин, після чого проводили аспірацію 1 мл верхнього шару плазми та клітинного шару, що містив мононуклеарні лейкоцити, мезенхімальні та гемопоетичні клітини. З пробірки виконувалася аспірація 1 мл верхнього шару плазми та клітинного шару 9 (див. рис. 2.3).

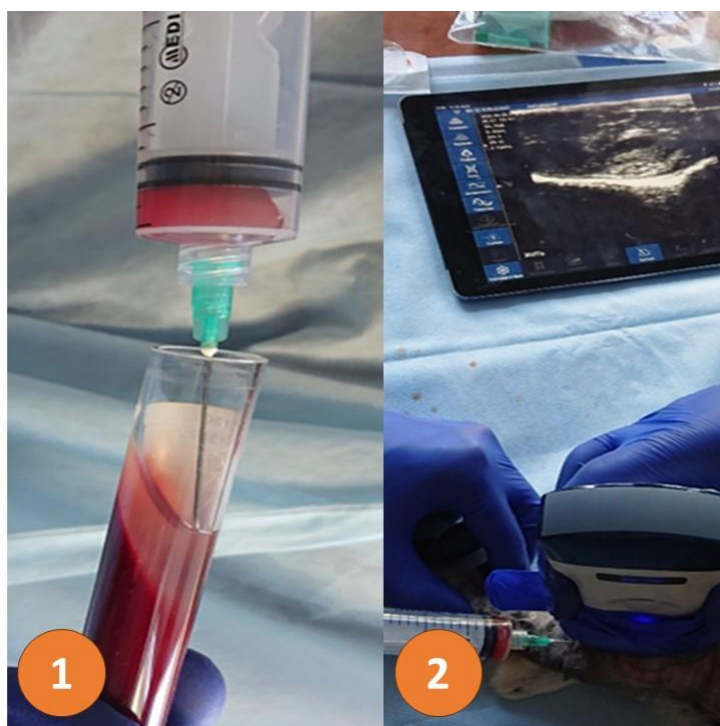


Рисунок 2.3 – Фото. Ведення аутологічного аспірату кісткового мозку в ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки кроля під сонографічним контролем. 1 – забор фракції аутологічного аспірату кісткового мозку; 2 – введення аутологічного аспірату кісткового мозку у ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки під сонографічним контролем.

Методика одержання суспензії жирової тканини. Через доступ до 2 см виконували забор 5 мг черевного сальника, який подрібнювали механічним способом до стану суспензії. Зазначену суспензію гомогенезували за допомогою пропускання через міліметровий отвір двох з'єднаних шприців. Після чого її центрифугували при 760 g протягом 8 хвилин. Ведення суспензії жирової тканини в ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки кроля показано на рис. 2.4.

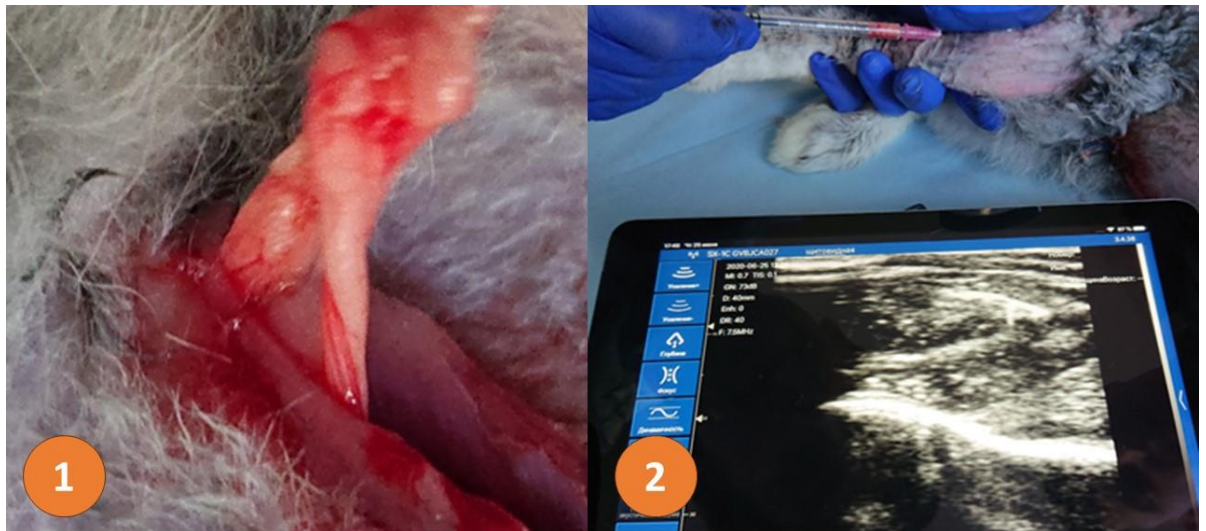


Рисунок 2.4 – Фото. Ведення суспензії жирової тканини в ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки кроля під сонографічним контролем.
 1 - забор черевного сальника; 2- введення суспензії жирової тканини в ішемізовані м'язи заднього глибокого футляру гомілки кроля під сонографічним контролем.

Дослідних тварин виводили з експерименту на 5, 15 і 30 добу після моделювання турнікетної ішемії кінцівки (по 5 тварин на кожен термін експерименту). Також у дослідження включено тварин, інтактної контрольної групи. Таким чином, до подальших досліджень включено 12 дослідних груп і 1 контрольна. Детальний розподіл тварин наведено вище у таблиці 2.1. Після виведення тварин з експерименту зразки м'язів кінцівки та периферійних нервів було відібрано для гістологічного та електронно-мікроскопічного досліджень. Для біохімічного дослідження здійснено забір скелетних м'язів.

Сонографічне дослідження

Сонографію проводили безпосередньо перед виведенням тварин з експерименту. Для подальшого аналізу сонографічних даних стосовно площини некрозу ішемізованих м'язів та визначення ентропії, як інтегрального показника

текстури сонографічного зображення, нами сумісно з Інститутом кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України було розроблено комп'ютерне забезпечення (відділ інтелектуальних відеосистем реального часу, при сприянні член-кореспондента НАН України, професора Боюна В.П.).

Теоретичним підґрунтям розробки даної програми було визначення текстури сонографічного зображення. В нашому дослідженні ми використали ознаки динамічності текстури, які, на наш погляд, в більшій мірі відповідають поставленим задачам виявлення особливостей в ультразвукових зображеннях для порівняння здорових і некротичних ділянок ішемізованих м'язів.

Основи динамічної теорії інформації базуються на визначенні інформації як міри змін, якими супроводжуються всі процеси що протікають у світі. Ця міра інформації виявилася надзвичайно плідною при вивченні інформаційних властивостей систем та процесів і дозволяє виділяти і використовувати корисну (динамічну) інформацію з випадкових стаціонарних і нестаціонарних сигналів, зображень, просторових полів, ітераційних процесів, рекурсивних процедур тощо, значно зменшуючи її надлишковість. Під δ -ентропії випадкового процесу $H\delta$ розуміють величину, яка визначається як середнє значення модуля похідної процесу і являє собою мірою невизначеності змін випадкового процесу, тобто визначає динамічність процесу:

$$H\delta = \frac{1}{T} \int_0^T |f'(t)| \cdot dt . \quad (2.1)$$

В дискретному вигляді $H\delta$ може бути представлена як

$$H\delta_x = \frac{1}{N_x} \sum_{i=1}^{N_x} |\Delta x_i| ; \quad H\delta_y = \frac{1}{N_y} \sum_{j=1}^{N_y} |\Delta y_j| ; \quad (2.2)$$

де: $H\delta_x, H\delta_y$ - δ -ентропія по рядках і колонках зображення;

N_x, N_y – кількість пікселів в рядку, колонці;

$\Delta x, \Delta y$ - різниці (перепади) значень яскравості між сусідніми пікселями в рядку та колонці.

Розглядаючи зображення як реалізацію випадкового процесу по рядках або колонках, можна визначити кількість динамічної інформації в рядках та колонках, що характеризує динамічні властивості текстури тканини на ультразвуковому зображенні.

Першим етапом виконували визначення площини некрозу. Датчик з частотою 7,5 МГц встановлювали уздовж та впоперек відносно виявлених некротично змінених ділянок м'язів. За 100% приймали фіксовану кількість пікселів, для апарату Philips HD-11 вона становила 248 на 587 пікселів. Самостійно вибирали ділянку сонографічної картинки, що підлягала дослідженню. Цю ділянку фіксували у вигляді прямокутника за допомогою спеціально розробленого графопобудовувача. У межах цієї визначеної площини програма вираховувала кількість нульових пікселів (тобто абсолютно чорних ділянок – ехонегативних) сонографічного зображення, які відображали некротичні зміни у м'язах (у цифровому та графічному зображенні) (рис. 2.5).

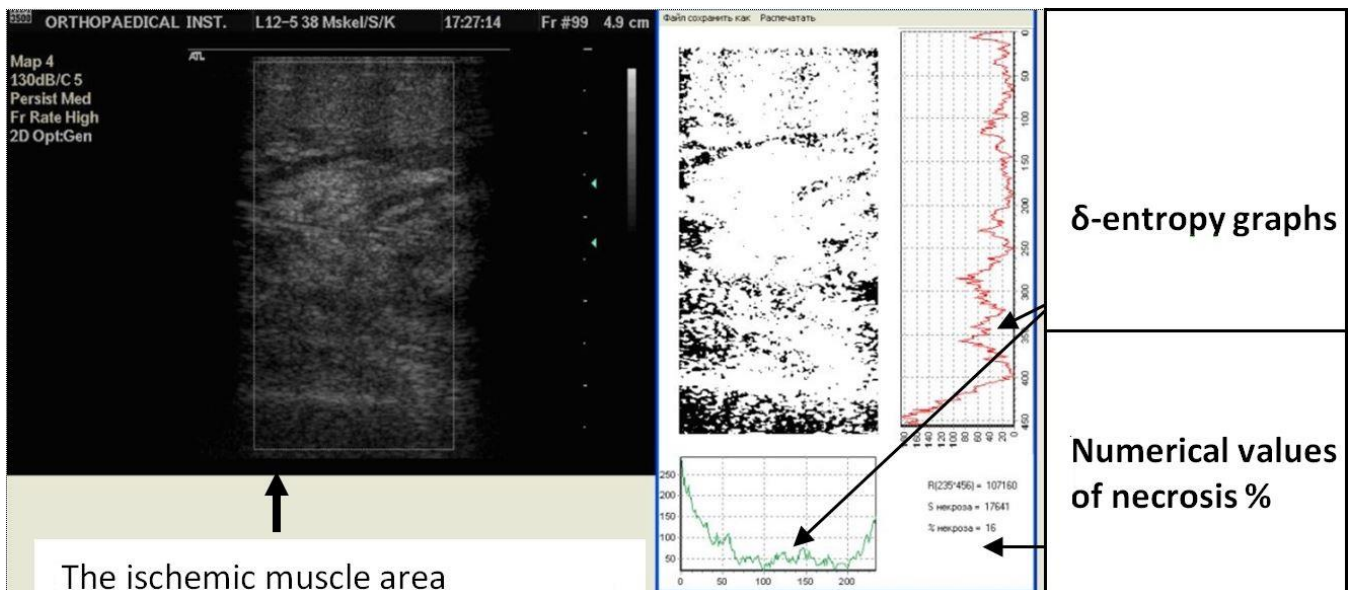


Рисунок 2.5 – Приклад визначення відсоткового значення некрозу при комп'ютерній обробці сонографічного зображення.

Другим етапом виконували визначення δ -ентропії у порівнянні однакових ділянок ішемізованих та контралатеральних здорових м'язів. Спочатку визначали площу некротизованої ділянки за принципами, що були описані вище; ідентична площа автоматично відображалась на сонографічному зображенні здорового м'яза. Після фіксації однакових площин програма вираховувала δ -ентропію по горизонталі та по вертикалі. При цьому будувались відповідні графіки змін динаміки по рядках і колонках та обчислювались середні значення динаміки відповідно для рядів і колонок виділених ділянок зображення. Статистичними методами визначали середнє значення ентропії.

2.2. Методика гістологічного дослідження

Сідничний нерв і скелетні м'язи гомілки кролів фіксували у 10%-розчині формаліну, розведеному на фосфатному буфері (рН 7,4). Термін фіксації 24 години, за температури 4°C. Зразки м'язів промивали від формаліну, зневоднювали у ізопропанолі (від 70% до 99,8%) і заключали у парафін (Leica Surgipath Paraplast Regular, Formula 'R', Німеччина). Із зразків, ущільнених у парафіні, виготовляли зрізи товщиною 6 мкм на мікротомі Thermo Microm HM 360 (Thermo Fisher Scientific, USA). Депарафіновані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином і заключали у синтетичне середовище (Merck, Germany).

Сідничний нерв заморожували у кріостаті і виготовляли заморожені зрізи товщиною 15 мкм. Поздовжні зрізи нервів імпрегнували азотнокислим сріблом за методом Коломійцева А.К. та Чайковського Ю.Б. і розміщали у синтетичному середовищі (Merck, Germany). Мікропрепарати досліджували на мікроскопі Olympus BX 51 (Olympus Corporation, Japan).

2.3. Методика електронної мікроскопії

Зразки скелетних м'язів та нервів фіксували у 2,5% розчині глутарового альдегіду, розведеного на фосфатному буфері. Фіксовані зразки дофіксували у 1% розчині чотирьохоксиду осмію. Матеріал зневоднення у висхідних концентраціях етанолу (70-100%) та ацетону заключати у епон-аралдитовій епоксидній смолі (Epon 812, Araldite 502). Ультратонкі зрізи з епоксидних блоків одержували на ультратомі Reihart. Зрізи фіксували на вольфрамових сітках і контрастували 2% розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Зразки досліджували на скануючому електронному мікроскопі Tescan Mira 3 LMU (Чехія) у режимі трансмісійної мікроскопії.

2.4. Методика морфометричного дослідження

Кількість фіброзної тканини (регіони колагеногенезу) у скелетних м'язах гомілки (*m. gastrocnemius*) оцінювали морфометрично. Для цього на зображеннях мікропрепаратів, які попередньо були відзняті при малому збільшенні $\times 40$, зроблено кластеризацію регіонів, відмінних за специфічним забарвленням. Мікропрепарати забарвлені пікросіріусом червоним містили регіони із специфічною червоною реакцією до колагену, тоді як м'язові волокна забарвлені у жовтий колір [74]. За допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) (Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) було розділено регіони, які відрізнялись за забарвленням. Специфічно забарвлені сіріусом червоним регіони, які оцінювали як ділянки колагеногенезу, були кількісно підраховані і далі одержано співвідношення кількості цих регіонів до загальної площі досліджуваних мікропрепаратів (5-7 мікропрепаратів на зразок). Далі одержані числові вимірювання усереднювали і результат представляли як відносну кількість сполучної тканини по відношенню до м'язового некрозу (%).

Проведено кореляційний аналіз між кількістю фіброзної тканини у зразку м'язу та показниками ентропії, які були одержані у тварин у кінцевий термін

експерименту. Для цього було використано ρ -кореляцію Спірмена. Силу та напрям зв'язку між двома кількісними змінними (колагеногенез – ентропія) проводили за шкалою Чаддока (до 0,3 - практично відсутній; 0,3-0,5 - слабкий; 0,5-0,7 - помітний; 0,7-0,9 - сильний). Результат трактували з урахуванням рівня достовірності статистичних вимірювань, де достовірною вважали кореляцію з $p \leq 0,05$.

У місцях із збереженою м'язовою тканиною було здійснено морфометричний аналіз зміни діаметру м'язовими волокнами. Для цього на мікрофотографіях при збільшенні $\times 200$ та $\times 400$ вимірювали діаметр окремого м'язового волокна. З кожної одиниці було одержано два виміри – по більшому та меншому діаметрі волокна. Далі числові вимірювання (мкм) усереднювали по кожному зразку.

Морфометрія сідничного нерва полягала у кількісному вимірюванні нервових волокон у графічних зображеннях. Для цього мікропрепарати сідничного нерва, які були імпрегновані азотнокислим сріблом, фотографували у поздовжній проекції при збільшенні $\times 400$ (тест-ділянки у мікрофотографії 420×550 мкм). З кожного зразка одержували 4-7 вимірювань і далі усереднювали дані на зразок (од./тест-зону).

2.5. Біохімічні дослідження

Аналіз продуктів перекисного окислення ліпідів

Перекисне окислення ліпідів аналізували за рівнем реакційної здатності молекул з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти), за методом Камішнікова (2004) [78]. Нагрівали 2,1 мл гомогенату тканини разом з 20% трихлороцтової кислоти та 0,8% тіобарбітурової кислоти у киплячій воді протягом 10 хв. Потім пробірки охолоджували і після центрифугування (3000 g протягом 10 хв) поглинання вимірювали при 540 нм. Значення ТБК-активних

продуктів виражали в наномолях еквівалентів малонового діальдегіду (МДА) на міліграм білка.

Визначення рівня NO^{2-}

Для оцінки рівня нітритів була використана реакція Гріса і проведений аналіз за методом Green [207].

Принцип методу. Нітрат у зразку зменшується за допомогою кадмію до NO^{2-} , який реагує з реагентом Гріса і утворює пурпурне / фіолетове забарвлення. Колір продукту виникає за умов водяної бані за температури $60^{\circ}C$, а охолоджений до температури $0^{\circ}C$ продукт має швидкість поглинання довжини хвилі 546 нм на спектрофотометрі.

Реактив Гріса складається з 1 частини 0,1% нафтилетилендіаміну дигідрохлориду в дистильованій воді та 1 частини 1% сульфаніламід (або сульфанілової кислоти) у 5% концентрованому H_3PO_4 ; 2 частини змішують разом протягом 12 годин після використання та зберігають охолодженими. Буфер рухомої фази являє собою 5% водний розчин NH_4Cl , доведений до рН 9,0 за допомогою борату натрію. Реактив Гріса і буфер дегазують перед використанням шляхом перемішування під частковим вакуумом при кімнатній температурі протягом кількох хвилин.

Зразки гомогенатів, які попередньо одержані з м'язів, розбавляли для отримання концентрації $NaNO_3$ або $NaNO_2$ від 5,0 до 20,0 пМ. Водні стандарти $NaNO_3$ і $NaNO_2$, у діапазоні від 5,0 до 50 пМ, аналізуються, щоб перевірити ефективність колонки. Зразки аналізували у двох повторях.

Визначення активності супероксиддисмутази (СОД)

Активність СОД визначали спектрофотометрично за методом Nishikimi et al. (1972) [146]. Для визначення активності СОД використовували систему Н-феназину метосульфат-нітросиній тетразолій. Після електрофорезу приблизно 0,01 одиниці ферменту гелеві циліндри спочатку занурювали на 20 хв у розчин, що містить 2,4 мМ нітросинього тетразолію і 28 мкМ феназину метосульфату,

після чого замочували протягом години у розчині 150 мкМ НАДН з 0,017 М пірофосфату натрію (буфер, рН 8,3). Ахроматична зона була видна в положенні, що відповідає СОД (позначено фарбуванням білка). Всю процедуру визначення супероксиддисмутази слід проводити в темряві, щоб запобігти розпаду нітросинього тетразолію. Поява O_2 при окисленні відновленого феназину метосульфату у повітрі також досягається шляхом утворення відновленого феназину метосульфату у зв'язку з ферментативною реакцією.

Визначення активності каталази

Активність каталази вимірювали методом, який ґрунтувався на реакції нерозкладеного перекису водню з молібдатом амонію з отриманням жовтуватого кольору, що має максимальне поглинання при 374 нм. Результати вимірювали спектрофотометричним методом М.Н. Nadwan [82].

Активність оцінювали при інкубації зразків в 1,0 мл субстрату (65 мкмоль/мл перекису водню в 60 ммоль/л натрій-калій-фосфатному буфері, рН 7,4) при 37°C протягом трьох хвилин. Реакцію зупиняли молібдатом амонію.

Реагенти:

1. Натрій-калій-фосфатний буфер (50 мМ, рН 7,4): цей буфер готують шляхом розчинення 1,1 г Na_2HPO_4 і 0,27 г KH_2PO_4 у 100 мл дистильованої води.

2. H_2O_2 (20 мМ) у 50 ммоль/л натрій-калій-фосфатному буфері: розчин стандартизують із використанням молярного коефіцієнта екстинкції $43,6 M^{-1} cm^{-1}$ при 240 нм.

3. Молібдат амонію (32,4 ммоль/л).

Константа швидкості реакції першого порядку (k) використовується для визначення активності каталази:

$$\text{Активність каталази } kU = \frac{2,303}{t} * \left[\log \frac{S^{\circ}}{S-M} \right] * \frac{V_t}{V_s} \quad (2.3)$$

де: t - час.

S° - абсорбція стандартної пробірки.

S - абсорбція пробірки.

M - абсорбція контрольного тесту (коригувальний коефіцієнт).

V_t - загальний об'єм реагентів у пробірці.

V_s - об'єм сироватки.

Визначення активності глутатіонпероксидази (ГП)

Активність глутатіонпероксидази визначали шляхом накопичення окисданого глутатіону GSSG методом Бернхейдера, модифікованим Переслегіною [160].

Реактиви:

1. 0,05 М калій-фосфатного буфера (рН 7,6),
2. 0,2 мМ відновленого глутатіону, 1мМ NaN_3 , 1 мМ ЕДТА, 0,075 мМ НАДФН ("Sigma", США),
3. 0,04 од. глутатіонредуктази,
4. 0,3 мг білка проби.

Спектрофотометричним методом вимірювали продукт реакції при довжині хвилі 340 нм протягом 4-5 хв. Активність ферменту вимірювали за формулою в перерахунку на окислений НАДФН (нмоль.мін $^{-1}$ ×мг $^{-1}$).

$$A = 1000 \times k / (6,22 \times m) \quad (2.4)$$

де k - коефіцієнт регресії;

6,22 - коефіцієнт екстинкції НАДФН;

m - концентрація білка в пробі в мг/мл.

Вимірювання рівня окислених білків

Рівень окислених білків вимірювали за допомогою 2,4-нітрофенілгідразину (ДНФГ) [152; 212].

Фракцію супернатантну ділили на дві рівні аліквоти, що містили приблизно 0,7-1,0 мг білка кожна. Обидві аліквоти осаджували 10% трихлороцтовою кислотою (мас./об., кінцева концентрація). Один зразок обробили 2н. HCl, а інший зразок обробляли рівним об'ємом 0,2% (мас./об.) динітрофенілгідразину (ДНФГ) у 2н. HCl. Обидва зразки інкубували при 25°C в 15-мл конічних скляних центрифужних пробірках і перемішували з 5-хвилинними інтервалами. Потім зразки повторно осаджували 10% трихлороцтовою кислотою (кінцева концентрація), а потім екстрагували етаноетилацетатом (1:1, об./об.), а потім повторно осаджували при 10% трихлороцтової кислоти. Осади обережно зціджували та розчиняли в 6 мМ гуанідину HCl з 20 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 6,5. Нерозчинний залишок видаляли центрифугуванням при 6000x g при 4°C. Було визначено різницю в спектрі зразка, обробленого ДНФГ, порівняно з контролем HCl, і результати виражені в нмоль включеного ДНФГ/мг білка на основі середнього поглинання $21,0 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ для більшості аліфатичних гідразонів.

Дослідження рівня загального білка

Концентрацію загального білка вимірювали за методом Бредфорда [43]. Принцип методу полягає у зв'язуванні кумасі брилліантового блакитного G-250 з білком. Зв'язування барвника з білком викликає зміщення максимуму поглинання барвника з 465 до 595 нм, і відстежується збільшення поглинання при 595 нм. Процес зв'язування барвника завершується приблизно за 2 хв. з хорошою стабільністю кольору протягом 1 години. Далі проби аналізуються спектрофотометрично.

Статистична обробка даних. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення StatPlus ver. 7.3.0. (AnalystSoft Inc. США). Нормальність розподілу вибірки даних проводили за критерієм Колмогорова-Смирнова. Міжгрупові розбіжності у вибіркових даних оцінювалися за допомогою непараметричного тесту Крускала-Уолліса та однопараметричного

аналізу дисперсійних варіацій ANOVA з корекцією Бонферроні. Різниця між групами вважалася достовірною при $p \leq 0,05$. Кореляційний аналіз проводили за критерієм Спірмена. Результати представлені у вигляді середнього значення (M) та стандартної похибки середнього значення ($\pm m$).

Біоетика. Дослідження проводилися згідно з рекомендаціями комісії з біоетики ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» Протокол №5, 07.12.2023 р. Усі процедури для лабораторних тварин проводилися відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та Директиви 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010).

РОЗДІЛ 3

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ У НЕКРОТИЗОВАНИХ М'ЯЗАХ ПРИ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНІЙ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ

3.1. Наукове підґрунтя до експериментального вивчення впливу тканинних технологій на розвиток некрозів у м'язах кінцівки при післятравматичній ішемії

В умовах сьогодення лікування посттравматичної ішемії кінцівок не втратило своєї актуальності у зв'язку із зростанням кількості високоенергетичних травм у структурі загального травматизму. Безперечним фактом є те, що вчасно виконана фасціотомія у разі компартмент синдрому є «золотим стандартом» у профілактиці та лікуванні ішемічної контрактури. Проте навіть вчасно виконана фасціотомія із розкриттям всіх уражених ішемією футлярів кінцівок і ревізією судинно-нервових пучків не завжди є запорукою попередження ішемічної загибелі м'язів та нервів. Також слід наголосити на тому, що за багато років у ортопедичній спільноті утворилась доктрина про спостереження і тільки консервативне лікування у пацієнтів у реактивно-відновному періоді ішемічної контрактури, що затягує процес активного лікування пацієнтів, а у важких випадках приводить до інвалідизації і неможливості виконання будь якої реконструкції ішемізованої кінцівки. Аналізуючи загальні тенденції суміжних спеціальностей, ми виявили велику зацікавленість серед кардіологів та невропатологів до використання протидіючих розповсюдженню ішемічного вогнища речовин. На сьогоднішній день первинна роль надається розробці та втіленню у клінічну практику аутологічних клітин, у вміст яких входять біологічні фактори, які сприяють репаративно-відновним процесам у м'язах і стимулюють регенерацію нервових волокон.

У сучасній ортопедичній практиці секреторні білки та/або фактори росту широко використовуються з метою пришвидшення та/або покращення регенерації та репарації кісток і м'яких тканин. Поряд із цим, вивчення впливу застосування аутологічних продуктів на дегенеративно-дистрофічні, регенеративні та ішемічні процеси, у більшості своїй, мають суто експериментальний характер. Серед клітинних технологій, що широко вживаються у клінічній практиці, зокрема у пластичній, щелепно-лицьовій хірургії тощо, використовують суспензію мезенхімальних клітин червоного мозку і жирових клітин, а також тромбоцитарну плазму. Багато експериментальних робіт довели позитивний вплив клітинної терапії на сполучну та нервову тканину, а також м'язи серця, через вивільнення факторів росту (PDGF, IGF-1, TGF- β тощо). Вивільнення цих факторів має як центральний вплив так і місцевий, причому не відбуваються імунні реакції, як на рівні місцевого так і на рівні гуморального імунітету.

Стосовно ішемії, останнім часом все більше приділяється уваги застосуванню саме аутологічної суспензії клітин червоного мозку, що зумовлено їхньою здатністю диференціюватися одночасно по декільком лініям, зокрема у міоцити та ендотеліоцити. Разом із тим, така мультилінійна диференціація може бути причиною аберацій і мутацій клітин, що робить їх небезпечними у онкологічному сенсі. Щодо використання аутологічної тромбоцитарної маси та суспензії жирової тканини, багато авторів виказують думку щодо наявних низьких показників виживання зазначених клітинних препаратів у ішемічному середовищі. Саме тому за мету нашого дослідження ми обрали те, щоб дослідити власноруч окремий вплив клітинних препаратів (концентрату тромбоцитарної маси, аутологічного аспірату кісткового мозку та суспензії жирової тканини) на можливу редукцію некротизованих м'язів та периферичних нервів у якості клітинно-метаболических регенераторних факторів. Для подальшого гістологічного дослідження було обрано анатомічні структури заднього футляру гомілки, а саме задній великогомілковий м'яз та великогомілковий нерв. Гістологічне

дослідження дозволило нам оцінити масштаби локалізації та рівень гіпотрофічних та атрофічних змін у ішемізованих скелетних м'язах та нервах. З метою демонстрації саме механізмів ішемічної руйнації та протидії їй проводили біохімічне дослідження ішемізованих нервів та м'язів, для розкриття метаболічних механізмів ішемічного ушкодження та впливу на нього клітинних препаратів у вигляді концентрату тромбоцитарної маси та суспензій жирової тканини і аспірату кісткового мозку.

Однією з складних проблем, що виникають при лікуванні пацієнтів з ішемічною контрактурою, є чітка діагностика та прогнозування перебігу у реактивно-відновному періоді (9-18 місяців від епізоду компартмент синдрому) [37; 108]. На прогноз впливають безпосередні наслідки пошкодження м'язової тканини наприкінці цього періоду, а саме кількість м'язових волокон та динаміка некротичних змін. Тому, питання методів чіткого, ґрунтовного визначення характеру патологічного процесу в уражених м'язах є надзвичайно важливим. Проведений аналіз літератури з цієї проблеми дозволив виявити лише поодинокі роботи, зокрема роботи Fletcher [69], присвячені ультразвуковому дослідженню (УЗД) скелетних м'язів у випадку ішемічної контрактури, хоча, на нашу думку, саме ультрасонографічне дослідження із застосуванням сучасних методик цифрової обробки інформації може відкрити нові можливості у прогнозуванні перебігу реактивно-відновного періоду ішемічної контрактури. А при можливості проведення морфологічного дослідження можна встановити особливості формування фіброзу на місці пошкоджених, некротизованих м'язів. Формування фіброзів є безпосередньою структурною основою контрактур, які негативно впливають на периферичні нерви пошкодженої кінцівки та функцію кінцівки (D.K. Meena [137]). У цій експериментальній роботі зроблено спробу оцінити ступінь пошкодження скелетних м'язів кінцівки та розвиток фіброзу після гострої ішемії кінцівки та за умов локального введення аутологічних клітинних засобів.

З метою стандартизації дослідження та отримання початкових кількісних показників ішемічного та регенеративного процесу, першочергово ми дослідили зміни тканин кінцівки за допомогою ультрасонографічних показників, на макроскопічному рівні, і далі було проведено гістологічні дослідження інтактних та пошкоджених м'язів та нервів кінцівки.

3.2. Ультрасонографічне дослідження скелетних м'язів в умовах травматичної ішемії

В результаті обробки даних δ -ентропії були отримані узагальнені середні значення динаміки, що дозволило оцінити її зміну між двома зображеннями, а графіки змін динаміки по рядках і колонках дозволяли використати додаткові ознаки змін щільності тканини (рис. 3.1). Такими додатковими ознаками були:

- максимальні і мінімальні відхилення в графіках від узагальнених середніх значень,
- відстані між екстремумами на графіках, які характеризують товщини шарів тканини та їх зміни,
- низька динаміка ділянки була ознакою некрозу, її можна було сегментувати та оцінити її площу і відсоток від досліджуваного зображення тощо.

На графіку праворуч картина на зображенні більш плавна, що й відображається в показниках $H\delta x$, $H\delta y$ і особливо $h\delta x$, $h\delta y$, які являються приведеними до максимального значення різниці яскравості в сонографічному зображенні і дозволяють оцінювати динамічні характеристики в різних діапазонах яскравості. Показники $H\delta x$ зазвичай у 2-3 рази перевищують показники $H\delta y$, що пов'язано з орієнтацією тканин в горизонтальному напрямку. Результати дослідження δ -ентропії у експериментальних групах наведені у таблиці 3.1.

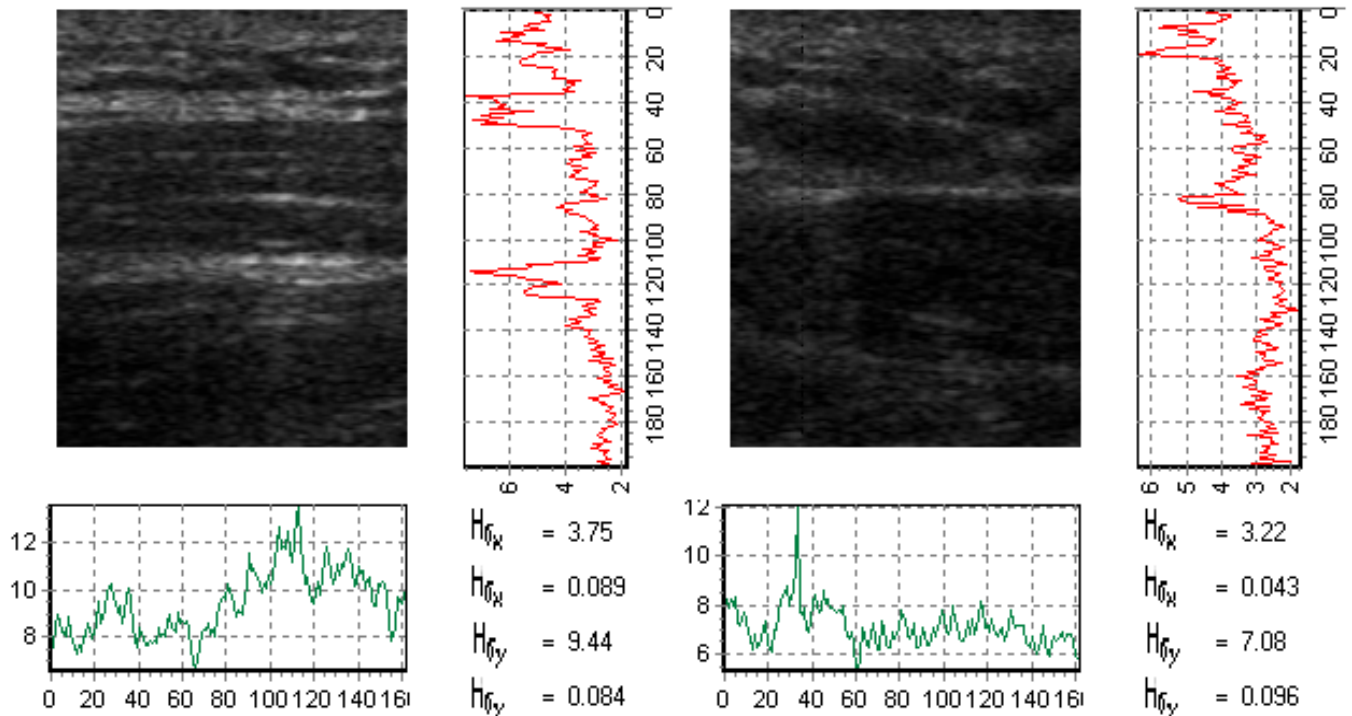


Рисунок 3.1 – Приклад визначення δ -ентропії при комп'ютерній обробці сонографічного зображення.

Статистичний аналіз результатів сонографічних досліджень показав достовірне ($P \leq 0,05$) зниження показника вертикальної δ -ентропії на 5 добу у групі з турнікетною ішемією та введенням клітинного аспірату кісткового мозку. У всіх інших групах в інші терміни кореляційний зв'язок між вертикальною δ -ентропією та горизонтальною δ -ентропією і ступенем некрозів м'язів був невиражений або відсутній. Ми дійшли висновку, що значущим показником у сонографії м'язів є вертикальна δ -ентропія, значення якої корелює з ступенем некрозу скелетних м'язів і може бути використана для оцінки і прогнозу лікувального ефекту від застосування аспірату кісткового мозку в ранні терміни реактивно-відновлювального періода ішемічної контрактури.

Таблиця 3.1 – Показники δ -ентропії при сонографічному дослідженні ішемізованих м'язів під впливом клітинної терапії

№	Група	Термін дослідження					
		5 доба		15 доба		30 доба	
		δ -ентропія					
		<i>вертикаль на δ- ентропія</i>	<i>горизонт альна δ- ентропія</i>	<i>вертикаль на δ- ентропія</i>	<i>горизонт альна δ- ентропія</i>	<i>вертикаль на δ- ентропія</i>	<i>горизонт альна δ- ентропія</i>
1	Інтактний контроль**	9.25±0.30 5.14±0.49					
2	Ішемія	6.85 ± 0.47*	5.65 ± 0.29	8.03 ± 0.12	5.63 ± 0.25	8.86 ± 0.31	6.12 ± 0.17
3	Ішемія + концентра т тромбоци тарної плазми	8.69 ± 1.00	6.61 ± 0.30	8.46 ± 0.60	6.40 ± 0.42	8.29 ± 0.47	6.22 ± 0.37
4	Ішемія + аспірат кістковог о мозку	8.46 ± 0.31*	6.18 ± 0.42	8.83 ± 0.37	5.26 ± 0.32	9.19 ± 0.37	5.17 ± 0.42
5	Ішемія + аспірат жирової тканини	8.49 ± 0.31	6.05 ± 0.41	8.89 ± 0.37	5.23 ± 0.32	8.37 ± 0.20	5.09 ± 0.42

Примітка: * - $P \leq 0,05$ достовірні значення; ** - одноразове дослідження.

3.3. Макроскопічне дослідження м'язів гомілки після моделювання ішемії

Перед забором зразків м'язів гомілки для гістологічного та біохімічного дослідження було оцінено зміни м'язів на макроскопічному рівні. На Рисунку 3.2 показано макрофотографії ішемізованої кінцівки. На 5 добу експерименту м'язі тканини дослідної кінцівки характеризувались різким набряком і кровонаповненням. Під фасцією м'язів виявлено накопичення інтерстиційної тканини. При надрізі фасції реєстрували виділення від 0,5 до 2,0 мл рідини. Судини різко кровонаповнені, наявні ділянки геморагічного просочення м'язів. Консистенція м'язів гомілки змінена: поверхневі м'язи набрякли, м'язи з втратою кольору (від рожевого до жовто-білого), глибокі м'язи більш пружні, рожевого кольору. На 15 добу ступінь набряку був меншим порівняно з 5 добою, м'язова тканина більш пружною. Реєстрували крововиливи і поверхневі функціональні судини (субфасціальні).

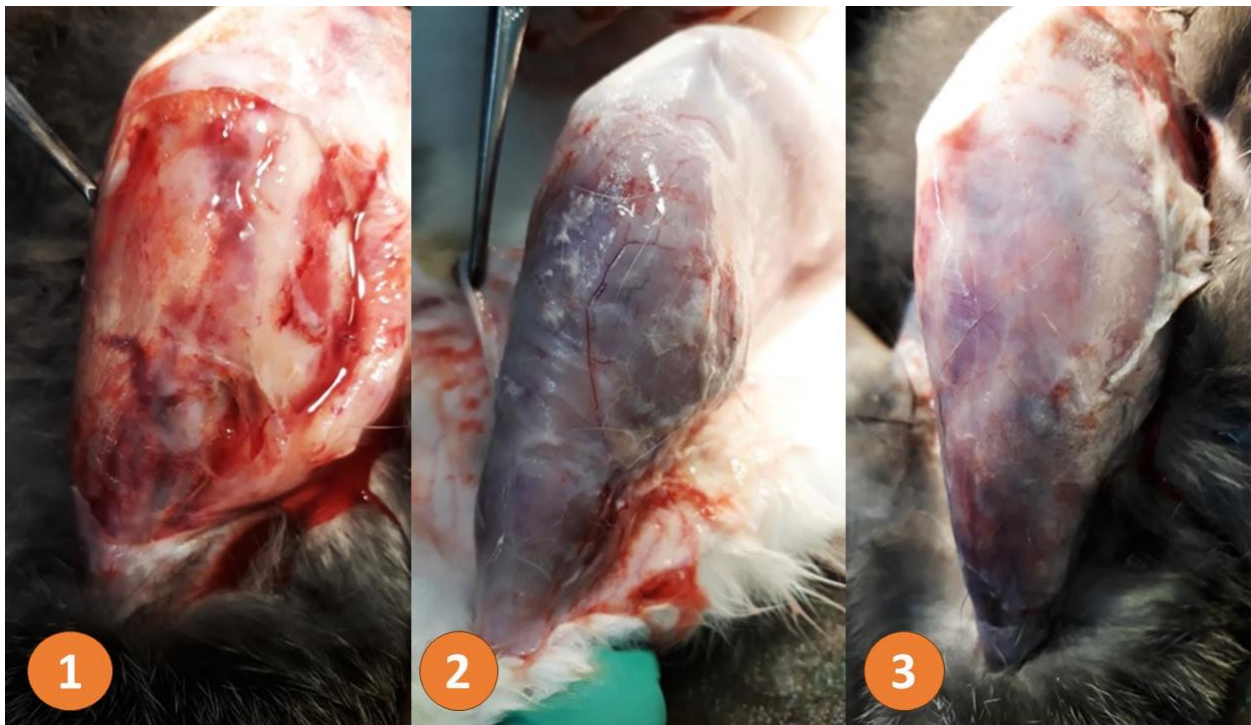


Рисунок 3.2 – Фото. Макроскопічне дослідження м'язів гомілки кролів з ішемією. Примітка: 1 – 5 доба; 2 – 15 доба; 3 – 30 доба.

На 30 добу надлишкової інтерстиційної рідини вже не реєстрували, судини були кровонаповнені, виявлено окремі ділянки геморагічного просочення м'язової тканини (рис. 3.3). Колір м'язів змінений у бік рожево-жовтого, жовто-білого. Тобто після моделювання 2-годинної механічно індукованої ішемії-реперфузії відбувається механічне пошкодження м'язів гомілки, накопичення інтерстиційної рідини і набряк м'язової тканини, який у зменшується після 5 доби і замінюється гіпотрофічними змінами м'язів.

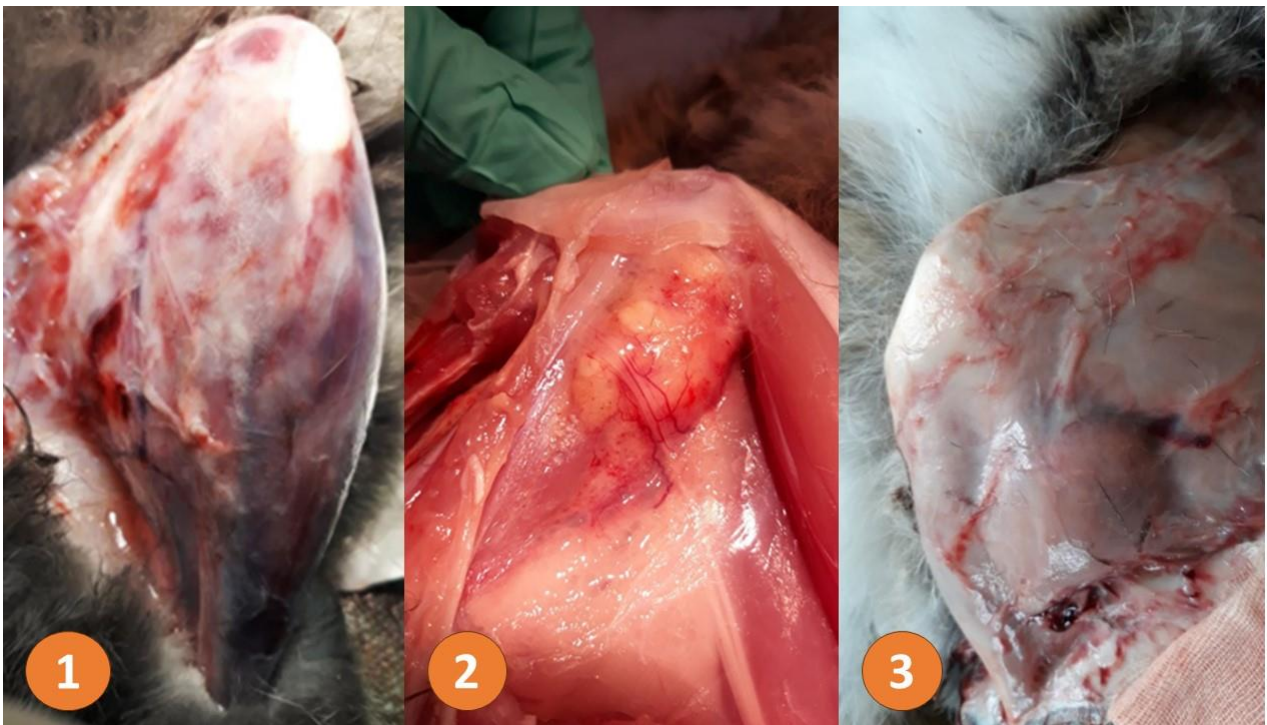


Рисунок 3.3 – Фото. Макроскопічне дослідження м'язів гомілки кролів з ішемією та введення аспірату жирової тканини і кісткового мозку на 30 добу.
Примітка: 1 – ішемія, 30 доба; 2 – аспірат жирової тканини, 30 доба; 3 – аспірат кісткового мозку, 30 доба.

На 30 добу у групах з тромбоцитарною плазмою і аспіратом кісткового мозку ділянок де відбувалось введення клітинних субстратів не виявлено. Тоді як у групі з аспіратом жирової тканини виявлено зони введення аспірату, організацію

сполучної тканини і ангиогенез, що свідчить про інкапсуляцію аспірату. Для дослідження гіпотрофічних змін м'язів, стану кровоносних судин і нервів гомілки проведено гістологічні та електронномікроскопічні дослідження.

3.4. Результати гістологічних досліджень м'язів гомілки на тлі ішемічного пошкодження кінцівки

При гістологічних дослідженнях м'язів гомілки вивчали зміни фасції м'язів та перимізію міонів, зміни кровоносних судин та м'язових волокон. Дослідження було розпочато з аналізу морфологічної будови скелетних м'язів гомілки у контрольній групі кролів. Так, фасція була побудована з щільно організованих шарів колагенових волокон і окремих фібробластів. Під фасцією спотерігались локалізовані міони м'язових волокон, які розділені стромальними елементами – перимізієм. У перимізії виявлено структурно збережені кровоносні судини середнього калібру – артерії та вени. Ступінь кровонаповнення відрізнявся між різними ділянками м'язів та зразків тварин. Морфологічних ознак пошкодження стінки судин та втрати цілісності не виявлено. Стінка артерій та вен містила декілька шарів гладких міоцитів у м'язовій оболонці. М'язові волокна щільно організовані у міонах, яскраво забарвлені, містили поодинокі міоядра та чітко виражену поперечну посмугованість вздовж всього волокна, що свідчить про їх інтактний морфо-функціональний стан (рис. 3.4).

Структурні зміни у групі з ішемією кінцівки були різко виражені, характеризувалися пошкодженням кровоносних судин, стромальних елементів та м'язових волокон. Виявлено залежність розвитку порушень від часу після моделювання ішемії. На 5 добу зміни були пов'язані з механічним та ішемічним пошкодженням, а на 30 добу характеризувались прогресуючою гіпо- та атрофією м'язових волокон. Оцінку розвитку морфологічних порушень проводили відповідно до структурних утворень м'язу.

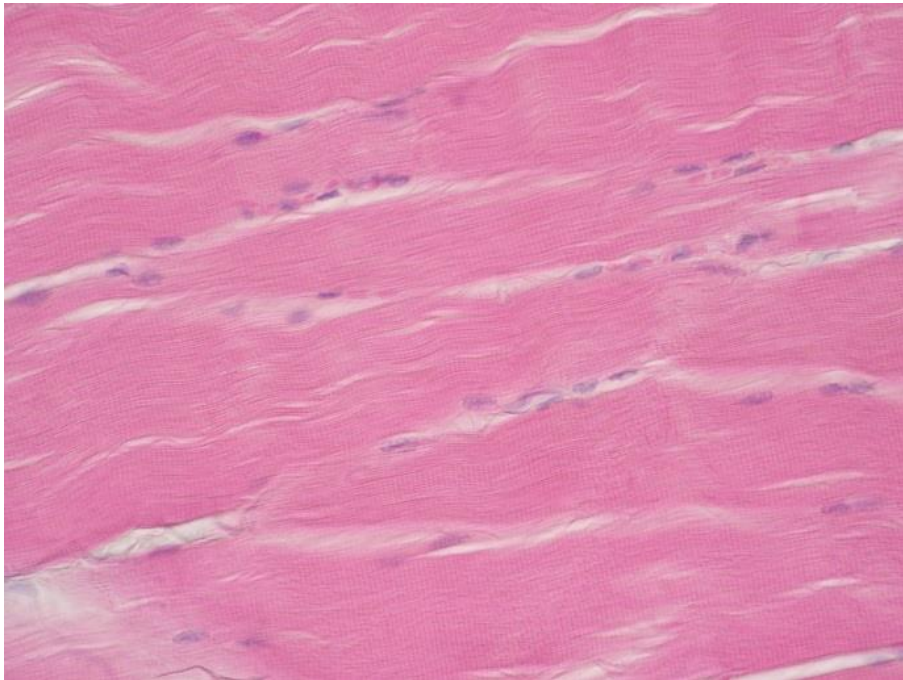


Рисунок 3.4 – Морфологія скелетних м'язів гомілки контрольної (інтактної) групи кролів. М'язові волокна структурно інтактні, містять поперечну посмугованість і міоядра. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

Зміни фасції м'язів

У фасції м'язів та стромальних елементах виявлено пошкодження та структурні перебудови сполучної тканини. Встановлено збільшення товщини стінки фасції, що пов'язано з розволокненням її білкових волокнистих утворень. Зовнішній контур фасції залишався подібним до інтактного, а зі сторони внутрішнього боку виявлено різке збільшення щільності фібробластів. Фібробласти заповнювали утворені в результаті механічного пошкодження та набряку безклітинні ділянки під фасцією та поєднували фасцію з перимізієм навколо міонів. Ці зміни вказують на посттравматичну регенерацію сполучної тканини. Реакція сполучної тканини мала деякі відмінності в залежності від терміну експерименту. На 5 добу фібробласти проліферували під фасцією та разом з макрофагами елімінували продукти розпаду еритроцитів та некротизованих клітин. На 15 добу продуктів розпаду загиблих клітин не

виявлено, що вказує на їх повну елімінацію з м'язів, а фібробласти змінювали просторову структуру та щільність стромальних елементів м'язів у бік збільшення. Встановлено збільшення щільності клітин у перимізії, його загальної товщини і щільності. На 30 добу новоутворена сполучна тканина заповнювала проміжки між пошкодженими міонами і заміщувала атрофовані м'язові волокна.

Тобто при післятравматичному ішемічному ушкодженні відбувається реорганізація сполучної тканини м'язів і заміщення новоутвореною тканиною ділянок гіпо- та атрофії фасцикулів. Первинна реакція сполучної тканини полягає у проліферації та елімінації продуктів розпаду загинувших клітин, яка згодом змінюється на реакцію заміщення м'язової тканини.

Зміни кровоносних судин у м'язах

Дослідження мікроциркулярної системи м'язів показали структурні порушення у кровоносних судинах міонів. Ступінь пошкодження залежав від терміну експерименту після моделювання ішемії кінцівки. На 5 добу реєстрували значну кількість судин з ознаками деструкції, некрозу клітин стінки судини (рис. 3.5). Просвіт судин часто заповнений продуктами лізису еритроцитів, у просвіті окремих судин виявлено клітинний детрит, який ймовірно утворився в результаті десквамації внутрішньої стінки судини у просвіт. Такі зміни були зосереджені на рівні судин середнього калібру – артерій і вен – між міонами, у перимізії. Щільність дрібних судин була зменшеною, окремі капіляри стазовані, що є свідченням порушеної мікроциркуляції. Навколо судин виявлено значну кількість дериватів некротизованих клітин, порушену щільність волокнистих структур строми м'язів, окремі скупчення лейкоцитів або збільшення кількості фібробластів.

На 15 добу у судинах середнього калібру виявлено морфологічні ознаки відновлення перфузії: поява інтактних формених елементів крові у просвіті артерій і вен. У стінці таких судин реєстрували ядра клітин, тоді як судини на 5 добу часто були «без'ядерними». Навколо судин виявлено реорганізаційні зміни

строми м'язу, які полягали у різкому збільшенні щільності фіброblastів та волокнистих структур. Виявлені зміни вказують на відновлення окремих кровоносних судин і перфузії (рис. 3.6).

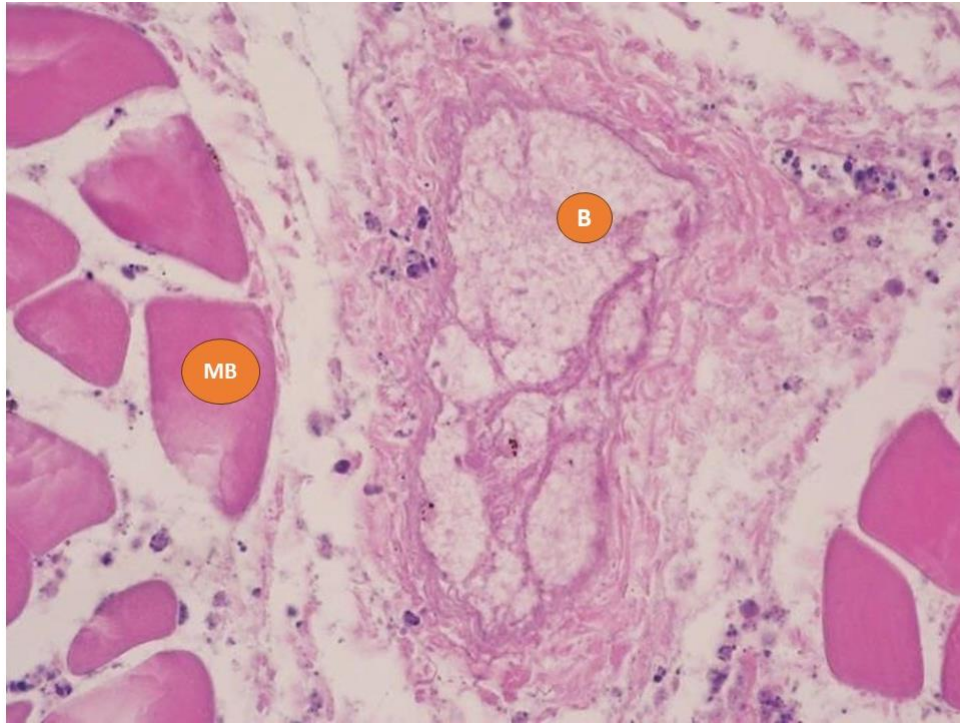


Рисунок 3.5 – Структурні зміни вени у скелетних м'язах гомілки кролів з ішемією кінцівки. Некротичні зміни вени на 5 добу експерименту, відсутні ядра клітин у стінці вени. У паравазальній сполучній тканині - клітинний детрит. Примітка: в – вена; mv – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

На 30 добу також виявлено більший ступінь відновлення кровоносних судин (рис. 3.7). У стінці судин збільшилась кількість ядер, особливо в артеріях середнього калібру. Часто реєстрували артерії з потовщеною стінкою, збільшеним співвідношенням м'язових елементів. Вени також характеризувались відновними процесами, зокрема в окремих судинах виявлено структурно інтактні клапани. Разом з тим, були виявлені й дилатовані капіляри. Тобто відновлення кровотоку у

міонах відбувається на рівні судин середнього калібру і у меншій мірі мікроциркуляторному руслі.

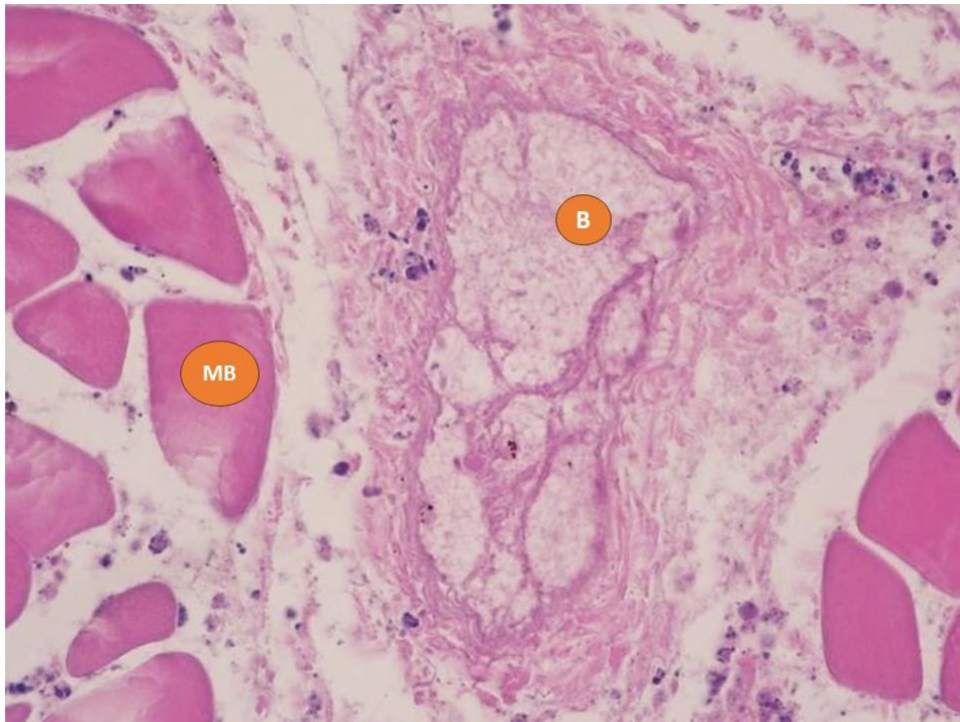


Рисунок 3.6 – Структурно збережена вена у скелетних м’язах гомілки кролів на 15 добу після моделювання травматичної ішемії кінцівки. У стінці вени реєструються ядра клітин, у просвіті вени - формені елементи крові. Збільшення щільності клітинних елементів у паравазальній тканині. Примітка: в – вена; мв – м’язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

Таким чином, при ішемії кінцівки відбувається пошкодження кровоносних судин, яке полягає у порушенні перфузії, тромбозі та лізисі формених елементів крові та деструктивних змінах клітин стінки судин. Зміни є неселективними, вражають артерії та вени. Починаючи з 15 доби після ішемії відбувається активація відновлення системи кровообігу у ішемізованих м’язах, а на 30 добу в артеріях репаративні процеси змінюються гіпертрофією м’язових елементів у стінці судини (рис. 3.7).

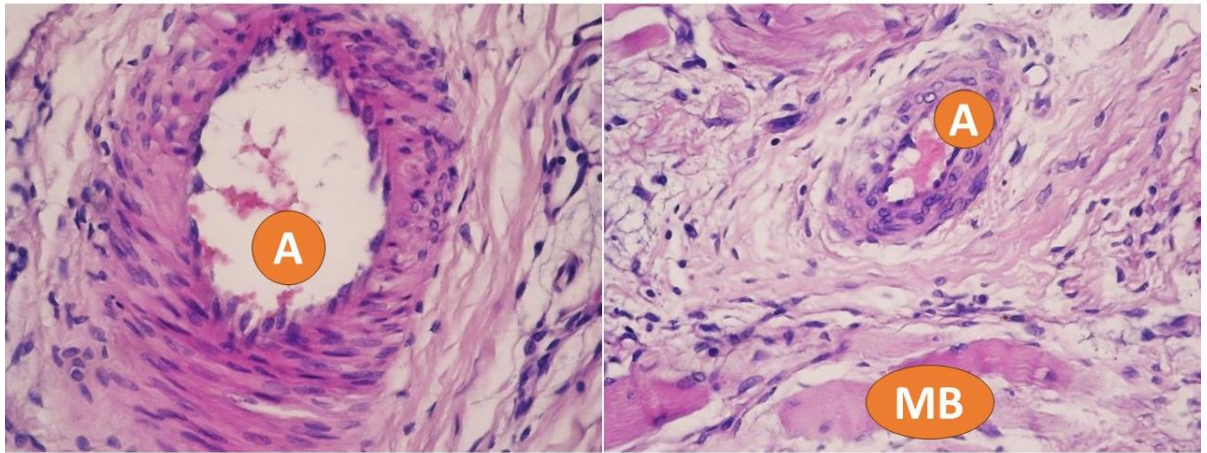


Рисунок 3.7 – Морфологія артерій різного калібру у скелетних м'язах гомілки кролів на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки. Стінка артерій структурно збережена, у просвіті реєструються форменні елементи крові, що вказує на непорушену перфузію на рівні артерій. Примітка: а – артерія; мв – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

Зміни м'язових волокон у скелетних м'язах при ішемії кінцівки

За результатами гістологічних досліджень встановлено різко виражені та прогресуючі гіпотрофічні та некротичні процеси у м'язових волокнах міонів (рис. 3.8). Загальною тенденцією порушень були деформація м'язового волокна, втрата поперечної посмугованості, зменшення товщини волокон, зменшення відновної щільності у м'язових волокнах у загальному обсязі досліджуваних зразків м'язів. У ендомізії та перимізії зафіксовано розшарування колагенових волокон внаслідок набряку, спостерігається присутність ділянок з мононуклеарною інфільтрацією, стаз судин капілярного типу.

Структурні порушення визначалися терміном експерименту. На 5 добу реєстрували як ішемічно пошкодженні, так і інтактні м'язові волокна. У ділянках травматичного та ішемічного пошкодження (субфасціальна ділянка) реєстрували зменшення товщини волокон, порушення архітектоніки ендомізії. Некроз м'язових волокон морфологічно полягав у фрагментації, деструкції м'язових

волокон, появи без'ядерних волокон. Реєстрували волокна, для яких характерною морфологічною ознакою була зміна забарвлення з ацидофілії на оксифілію (рис. 3.9). У таких волокнах не виявлялись ознаки поперечної посмугованості та міоядра, що вказує на їх некроз. Кількість клітинного детриту збільшувалась від міонів до фасції м'язів. Між порушеними м'язовими волокнами виявлено збільшення щільності клітин – активованих фібробластів та макрофагів. Реєстрували також деривати розпаду еритроцитів та клітин, які їх елімінують з тканини м'язу. У структурно незмінених міонах м'язові волокна мали збережену поперечну посмугованість, але щільність клітин та площа міоядер була збільшеною, що вказує на реакцію активації м'язових волокон у ішемізованому м'язі.

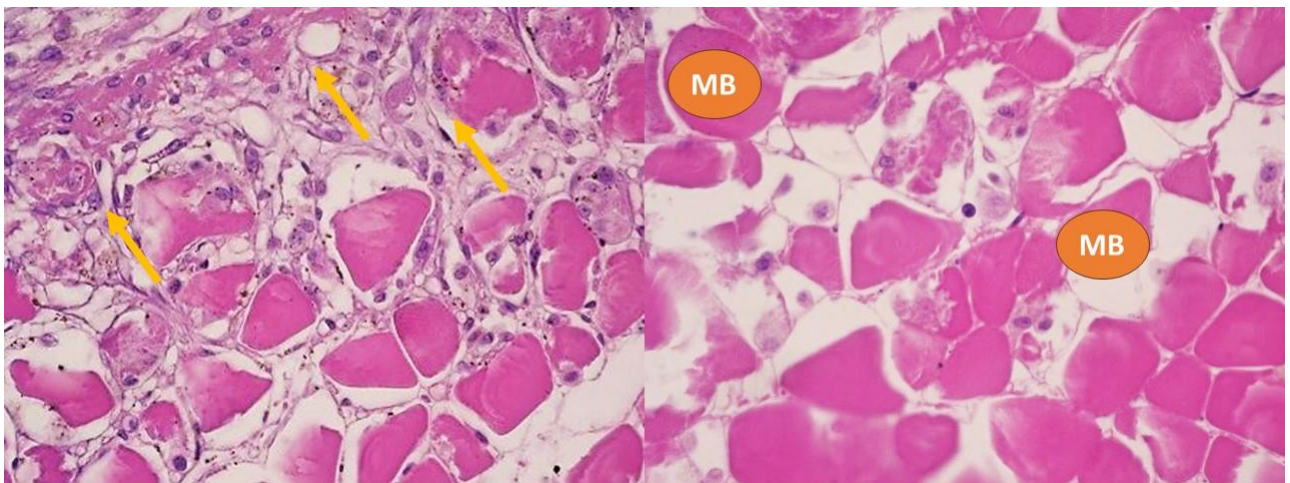


Рисунок 3.8 – Морфологія субфасціальної групи міонів у групі скелетних м'язів гомілки кролів на 5 добу після травматичної ішемії кінцівки. Некроз м'язових волокон, клітинний детрит, поява «вільних» клітин у ділянках ендомізію.

Примітка: мв – без'ядерні м'язові волокна; ← некроз і повна деструкція м'язового волокна. Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 40.



МВ

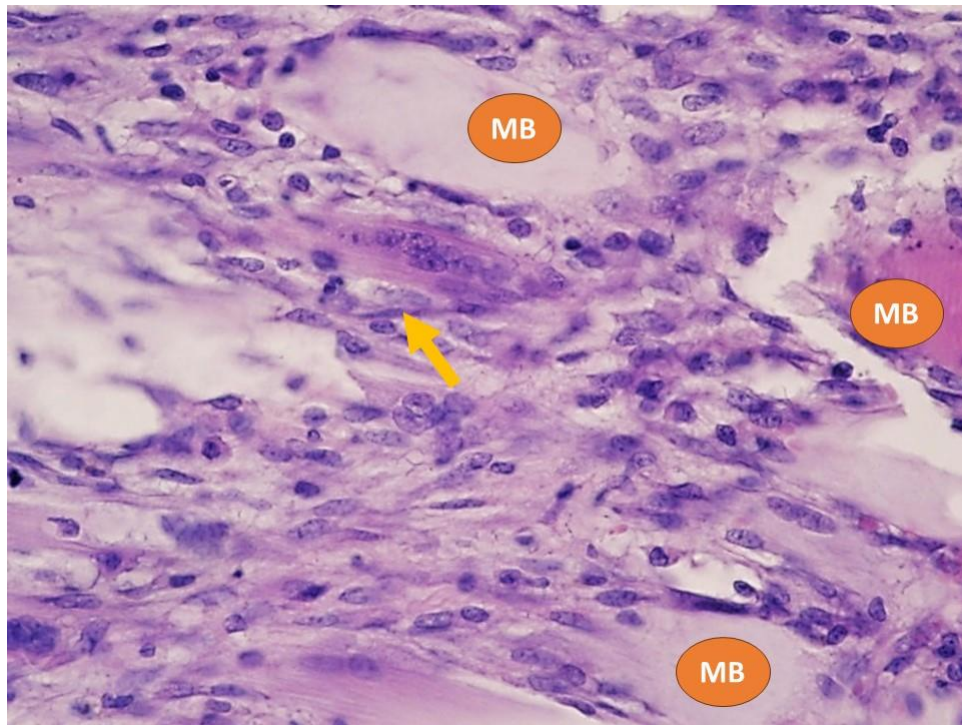


Рисунок 3.9 – Некроз м'язової тканини у субфасціальній групі міонів на 5 добу після травматичної ішемії кінцівки. Поява оксифілії у м'язових волокнах, вільних міоядер, реорганізації сполучної тканини між м'язовими волокнами.

Примітка: мв – пошкоджені м'язові волокна; ← поява груп міоядер.

Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 40.

Метод трансмісійної електронної мікроскопії значно розширив можливості дослідження зміни морфології м'язових волокон після травматичної ішемії. На 5 добу експерименту навколо окремих м'язових волокон та у інтерстиційному просторі реєстрували групи макрофагів і клітин з «бластоподібним» фенотипом. Макрофаги містять велику кількість цистерн, везикул і фагосом, що є цитологічним проявом їх активної участі в утилізації та елімінації продуктів дистрофічно-некротичних змін м'язових волокон (рис. 3.10). У цитоплазмі м'язових волокон різко зменшилась щільність скоротливих міофібрил, міофіламенти пошкоджені, фрагментовані, межі саркомерів вже неможливо диференціювати.

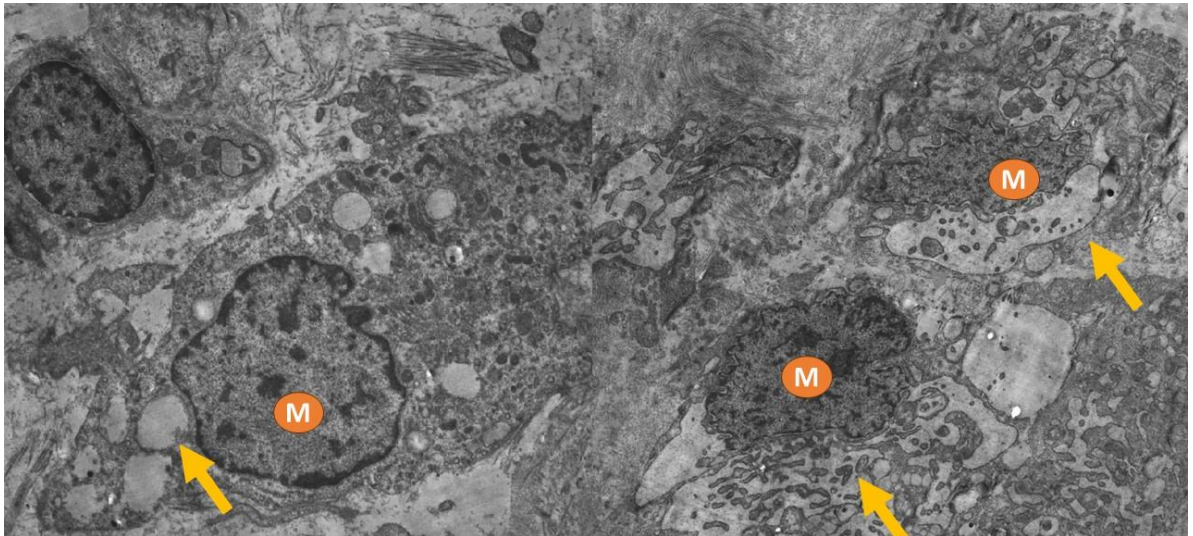


Рисунок 3.10 – Групи макрофагів у ділянці некрозу м'язів на 5 добу після травматичної ішемії кінцівки. Примітка: м – макрофаг, ← цистерни і везикули у цитоплазмі макрофага. Електроннограма, зб. 28000 і 33000.

На 15 добу встановлено зміну морфологічної картини у субфасціальній ділянці. Некроз м'язових волокон продовжувався: реєстрували деформовані волокна, одиниці у стані повної деструкції, окремі набряклі волокна з суттєвою оксифілією (зменшення інтенсивності забарвлення, втрата поперечної посмугованості). Між м'язовими волокнами, у інтерстиційному просторі, встановлено істотне збільшення щільності клітинних елементів, серед яких фібробласти, у меншій мірі макрофаги, велика кількість колагену. Макрофаги продовжували реєструвати у багатьох досліджених ділянках зразків м'язів, останні містять велику кількість фагосом різної морфології. Елімінація продуктів некробіозу ще не завершена. У глибоких міонах м'язів відмічено виражену гіпотрофію м'язових волокон, тоді як некроз вже не домінує (рис. 3.11).

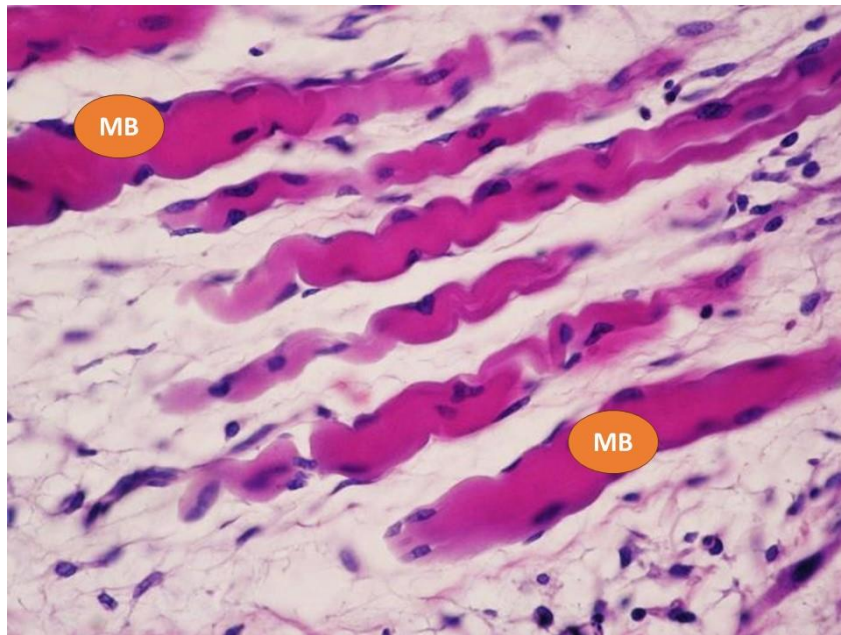


Рисунок 3.11 – Атрофія м'язової тканини у групі м'язів гомілки кролів на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки. Деформація, зменшення товщини м'язових волокон, різке збільшення інтерстиційного простору. Примітка: мв – м'язові волокна з ознаками гіпотрофії. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

Пошкоджені м'язові волокна стали деформованими, набули звивистої форми, різко зменшені у товщині. Інтерстиційний простір істотно збільшився, тобто відносний обсяг м'язових волокон у м'язі на 15 добу зменшився. Наслідком некрозу значного обсягу м'язових волокон і реорганізації інтерстиційної тканини стала зміна щільності і істотне збільшення сполучної тканини (рис. 3.12).

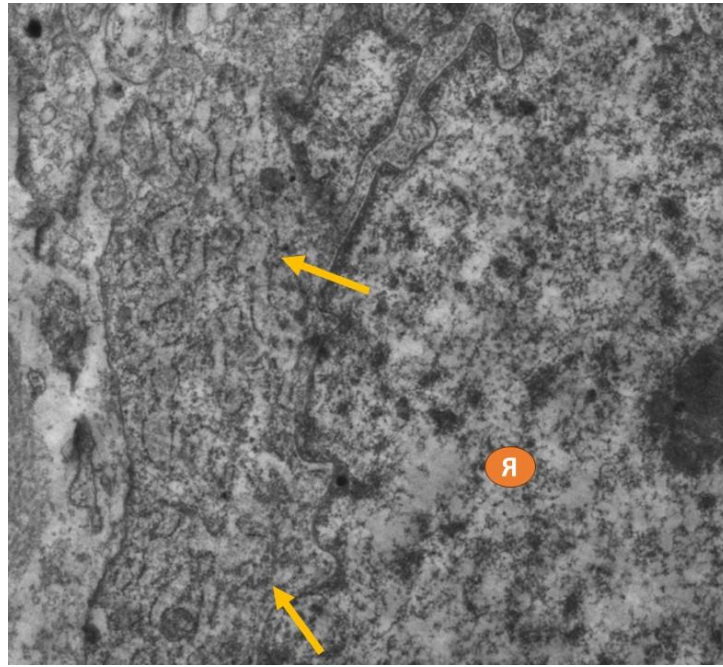


Рисунок 3.12 – Ультраструктура клітин з бластоподібним фенотипом. Субфасціальна ділянка м'язів на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки.

Примітка: я – ядро, ← цистерни ендоплазматичної сітки.

Електронограма, зб. 60000.

На 30 добу структурні зміни у м'язах мали поліморфний характер. У субфасціальній ділянці зміни не демонстрували суттєвої відмінності від попереднього терміну, а в деяких ділянках навіть продовжували прогресувати. Так, виявляли м'язові волокна у стані некрозу (рис. 3.13 і 3.14). Це супроводжувалось інтенсивною інфільтрацією лейкоцитів та макрофагів з повною деструкцією та потраплянням коагульованих білків у інтерстиційний простір у міонах. В результаті цього у інтерстиційному просторі виявляли велику кількість клітинного детриту, макрофагів, які фагоцитували продукти некробіозу. У цей термін відмічено появу клітин фагоцитів, які містили ШИК-позитивні гранули (на 15 добу реєстрували тільки поодинокі такі клітини) (рис. 3.15). Це є свідченням активної елімінації продуктів некрозу (глікопротеїнів, фібрину) з пошкодженої м'язової тканини. У деяких ділянках м'язові волокна вже відсутні,

натомість сполучна тканина заповнює субфасціальну зону, формуючи тканину, яка подібна до рубцевої тканини.

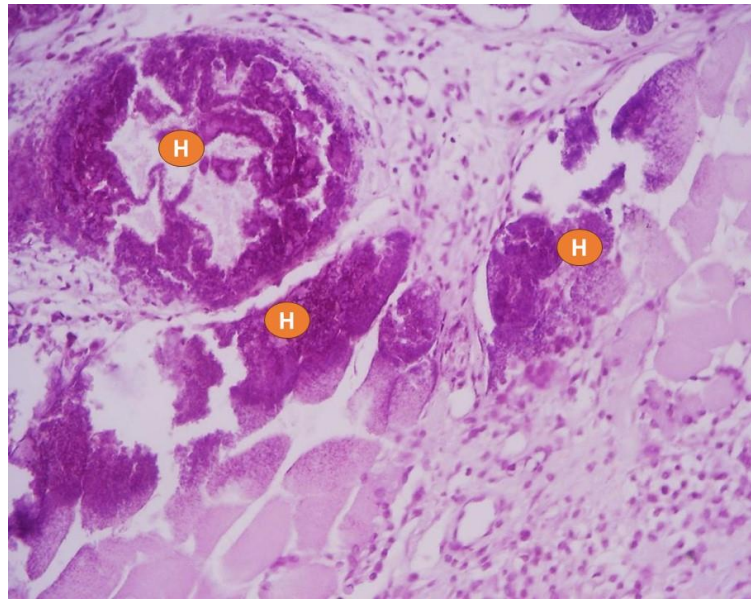


Рисунок 3.13 – Некроз м'язових волокон у скелетних м'язів гомілки кролів з ішемією кінцівки на 30 добу спостереження. Примітка: н – ділянки некрозу м'язових волокон. Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 10.

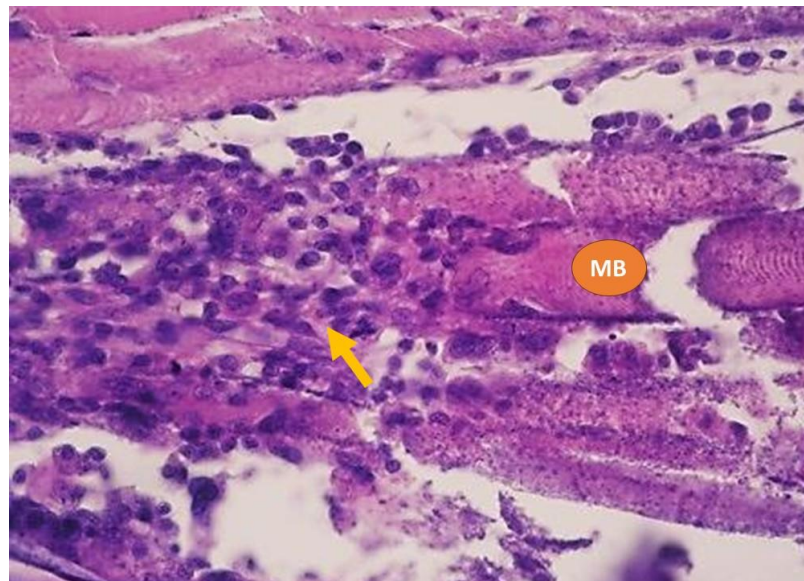


Рисунок 3.14 – Некроз і запалення у пошкоджених м'язах на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки. Примітка: мв – м'язові волокна; ← інфільтрація клітин. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

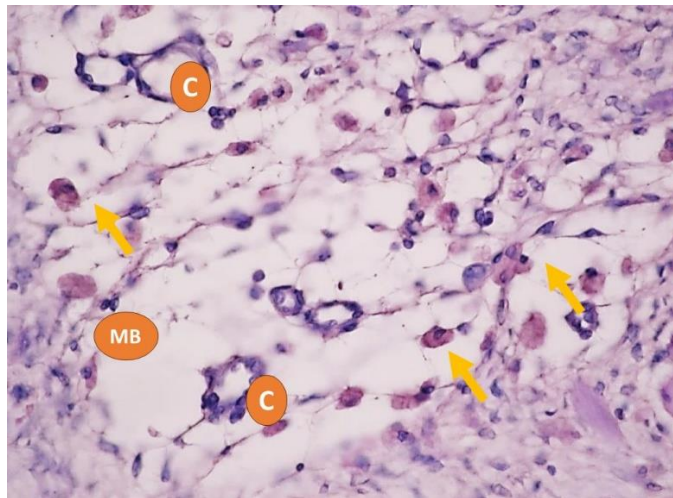


Рисунок 3.15 – Некроз м'язових волокон у скелетних м'язах гомілки кролів на 30 добу після моделювання ішемії кінцівки. Скупчення фагоцитів з ШИК-позитивними включеннями. Примітка: ← фагоцити; мв – пошкоджені м'язові волокна; с – судини. ШИК-реакція. Об. 40, ок. 10.

У глибоких міонах спостерігається гіпотрофія м'язових волокон (рис. 3.16). Останні мають істотно зменшену товщину, їх відносна щільність у досліджених зразках зменшилась.

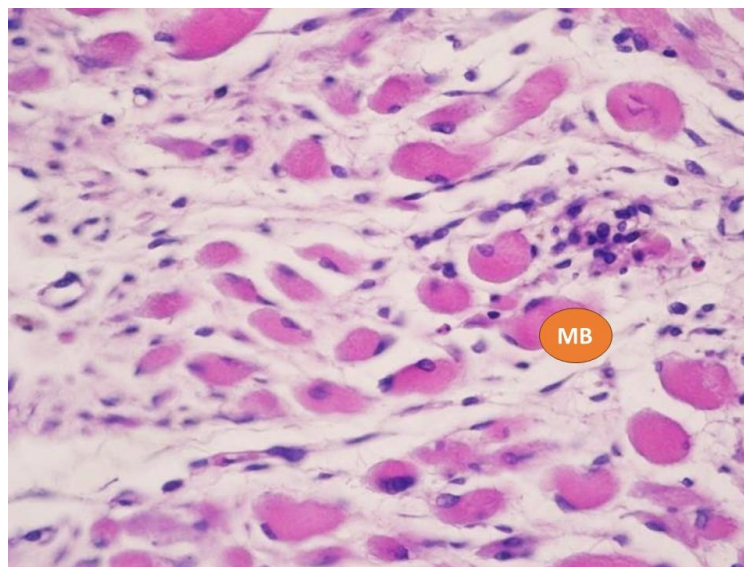


Рисунок 3.16 – Гіпотрофія м'язових волокон у скелетних м'язах гомілки кролів з ішемією кінцівки на 30 добу спостереження. Примітка: мв – м'язові волокна. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

На ультраструктурному рівні м'язові волокна на 30 добу характеризуються значною редуцією міофібрил, міофіламенти зазнали суттєвого пошкодження (див. рис. 3.17). У саркоплазмі відмічено зменшення щільності і розмірів мітохондрій, цистерни саркоплазматичної сітки майже відсутні. Міоядра часто мали атипову форму, зокрема в деяких виявлено інвагінації та атипові фібрилярні структури. В інтерстиційному просторі відмічено групи фіброblastів і бластоподібних клітин. Останні формують групи у вигляді коротких стрічок, що може бути свідченням формування нових міотубул.

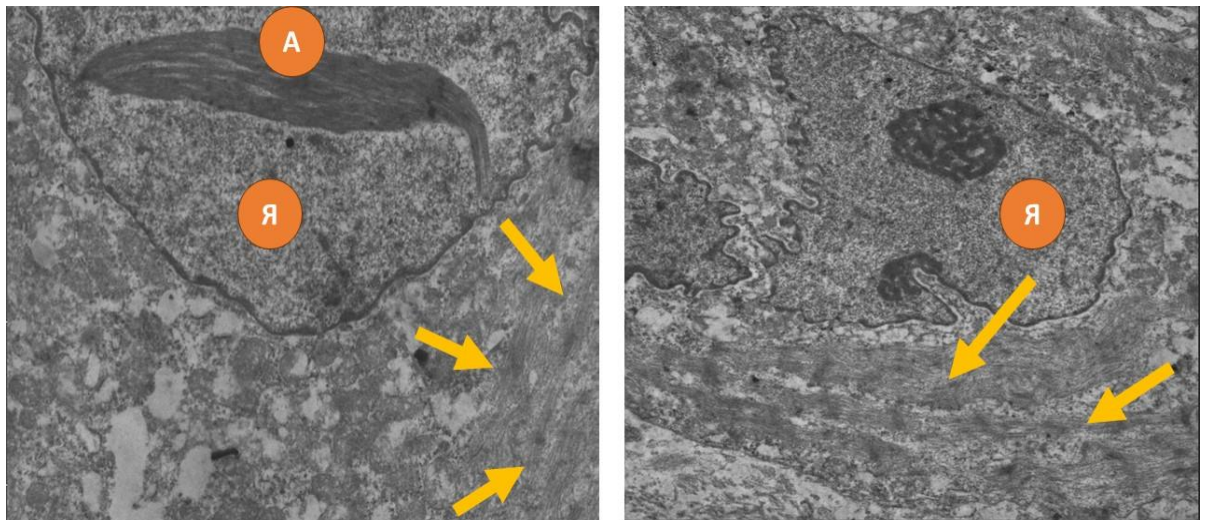


Рисунок 3.17 – Некробіотичні зміни у м'язовому волокні на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки. Примітка: я – ядро, а – атипові фібрилярні структури у ядрі; ← структурно порушені скоротливі міофібрили.

Електронограма, зб. 48000 і 45000.

Формування нових міотубул реєстрували також на загальноморфологічному рівні м'язової тканини. У невеликих групах м'язових волокон виявлено появу додаткових міоядер у саркоплазмі, невеликі групи ядер, скупчення ядер у вигляді стрічок (рис. 3.18). Тобто на 30 добу домінує гіпотрофія м'язової тканини, а реактивно-відновні процеси мають тільки фокальний характер на рівні окремих м'язових волокон і не мають потенціалу до значного відновлення м'язової

тканини. При цьому некробіотичні процеси залишаються остаточно не зупиненими і продовжуються у субфасціальній ділянці та на межі з глибшими групами м'янів, хоча елімінація продуктів некробіозу на 30 добу вже досягла значного рівня.

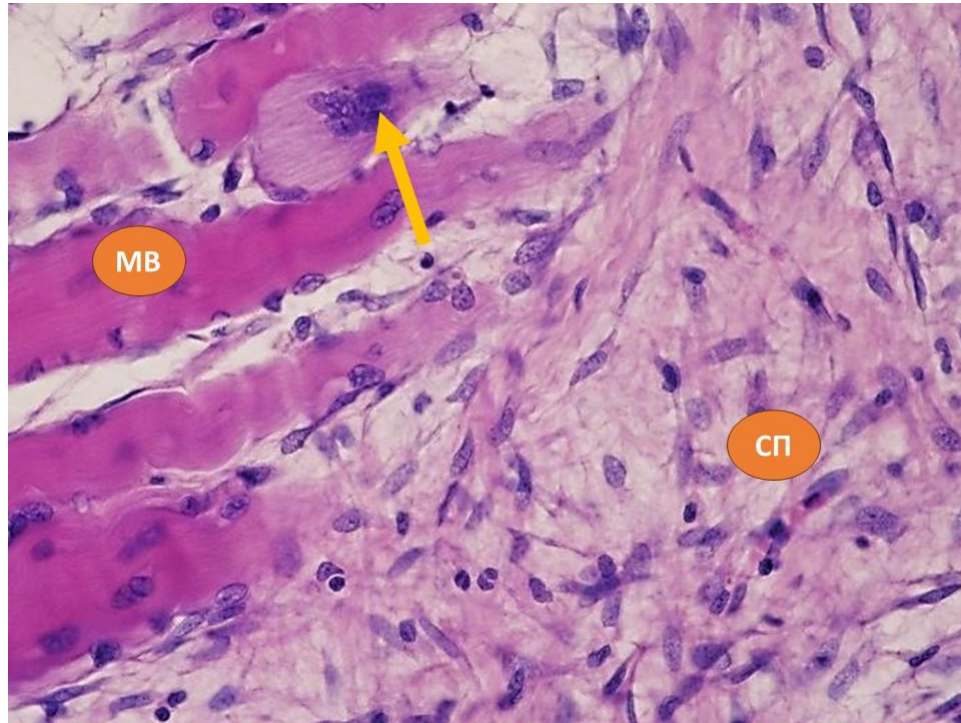


Рисунок 3.18 – Реорганізація сполучної тканини у пошкоджених м'язах на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки. Примітка: mv – м'язові волокна; сп – сполучна тканина; ← поява додаткових міоядер. Гематоксилін з еозином.

Об. 40, ок. 10.

Таким чином, ішемія кінцівки викликала різко виражені структурні зміни у скелетних м'язах, які полягають у прогресуючій гіпотрофії м'язових волокон, появі новоутвореної сполучної тканини та заміщенні м'язової тканини на сполучну. Слід зазначити, що процеси заміщення некротизованих м'язових волокон сполучною тканиною відбуваються досить стрімко. Так на 5 добу вже реєстрували окремі ділянки повної елімінації м'язових волокон та їх заміщенні фібробластами та макрофагами, які формують «ніжну» сполучну тканину. У

наступні терміни спостереження ці зміни прогресували від первинних осередків гіпотрофії, а на 30 добу додатково супроводжувались інфільтрацією макрофагів та наступним прогресуванням дистрофічних змін м'язової тканини. Некроз та гіпотрофії м'язової тканини при ішемії кінцівки завершується формуванням новоутвореної сполучної тканини і супроводжуються розвитком супутньої запальної реакції. Збільшення процесів фіброзу, які виникають в результатів розростання сполучної тканини, відбувається з внутрішніх шарів фасції та перимізію. Порушення кровоносних судин проявляються у некротичних змінах судин малого та середнього калібру у перші 5 діб після ішемії, частковому відновленні судин на 15 добу, регенерації та відновленні кровообігу у м'язах на 30 добу, а в деяких артеріях відбувалась гіпертрофія м'язової стінки, що найімовірніше пов'язано з компенсаторною регенерацією судин. Гіпотрофія м'язових волокон характеризувалась появою додаткових міо ядер та появою вільних клітин з «бластоподібним» фенотипом. Ці зміни є явними доказами активації ендогенних регенеративних процесів у м'язових волокнах. Але ці явища мають досить ізольований характер, виявляються в окремих м'язових волокнах і не є тотальними. З точки зору топографії некрозів, периферійні міони групи м'язів зазнали найбільшого пошкодження і тому у них домінують некробіотичні зміни, а ознаки регенерації м'язових волокон виявляються на межі ділянок некрозів і глибоких майже неушкоджених груп міонів. Застосування методу трансмісійної електронної мікроскопії дало можливість виявити ультраструктурні докази формування нових міотубул. Аналізу цих змін присвячено наступний Розділ.

Публікації до розділу 3:

Pidlisetskyu, A., Dolhopolov, O., Savosko, S., Makarenko, O. (2022). The influence of regenerative technologies on recovery processes in leg after traumatic ischemia (experimental study). *Orthopaedics, Traumatology, and Prosthetics*, 4, 63-69.

РОЗДІЛ 4

ПОШКОДЖЕННЯ СІДНИЧНОГО НЕРВА ВНАСЛІДОК ІШЕМІЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ КІНЦІВКИ

Травматична ішемія викликала значне пошкодження м'язової тканини. Ступінь пошкодження м'яза зменшувався від периферії до глибоких ділянок групи м'язів. Висунуто припущення, що нервово-судинний пучок може бути пошкоджений за таких умов. У клінічних випадках некомпресійна ішемія пов'язана із пошкодженням магістральних судин кінцівки (атеросклероз, емболія, васкуліт тощо) і частіше це є наслідком травматичного пошкодження кінцівки (Ю. Сорокин [16]). Ішемічна невропатія все ще залишається недостатньо дослідженою (V. Ugalde [205]). Це пояснюється тим, що у клінічних роботах автори описують окремі випадки з різною етіологією, тоді як експериментальні дослідження дали можливість дослідити розвиток пошкодження нервів кінцівки та їх відновлення. Основним недоліком останніх є те, що у постановці задач досліджень обирається один фактор – ішемія нерва – тоді як клінічні випадки ускладнюються тим, що два фактори – ішемія та прямий тиск на нерв – можуть бути наявні. Крім того, експериментальні роботи головним чином обмежені однією-двома моделями ізольованої компресії нерва (A. Muthuraman [145], Z.Y. Liu [121]), тоді як у клініці це є рідкісним випадком, а більшість компресійних пошкоджень є наслідком одночасної травми і компресії кінцівки, із значним пошкодженням скелетних м'язів і їх наступною атрофією, некрозом тканин. Гострий некроз скелетних м'язів і його наслідки (міоглобінурія, порушення електролітного обміну та гостра ниркова недостатність) досліджені значно краще, ніж некроз нервів кінцівки. Стан периферійних нервів при компресійній та некомпресійній ішемії може відображати стан усіх тканин кінцівки, а також ефективність проведеного лікування. Разом з тим в літературі недостатньо даних про ступінь пошкодження м'язів і периферійних нервів кінцівки при

компресійній травмі, а головне - їх чутливість до пошкодження і стимуляції відновних процесів. Саме тому окремим завданням роботи було дослідити зміни морфології сідничного нерва на 5, 15 і 30 добу після моделювання 6-годинної ішемії.

В якості контролю для аналізу морфологічних змін сідничного нерва було взято зразки інтактного сідничного нерва неоперованих тварин. Як видно на рис. 4.1, нервові волокна мають щільну і поздовжню орієнтацію у фасцикулах нерва. Сідничний нерв має фасцикулярну будову і містить 3-5 великих нервових стовбурів. Мікросудинне русло у нерві у більшій мірі також має поздовжню орієнтацію мікросудин, вони формують сітки та анастомози. Жодних морфологічних ознак структурних змін у непошкоджених нервах не виявлено, а щільність нервових волокон у нерві була обрана за контрольні значення для морфометричного дослідження.



Рисунок 4.1 – Інтактний сідничний нерв контрольної групи. Нервові волокна щільно орієнтовані у нерві. Примітка: нв – нервові волокна. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

У досліджених зразках сідничного нерва групи тварин, яким моделювали травматичну ішемію, на поздовжніх зрізах нервів виявлено деякі структурні зміни нервових волокон у фасцикулах сідничного нерва. Цілісність нерва була непорушеною, фасцикулярна будова була збереженою. Оболонки нерва без значного пошкодження, лише у епіневрії виявлено збільшену щільність окремих фіброblastів, що свідчить про клітинні реакції у стромальних елементах нерва, проліферації клітин епіневрію. У фасцикулах нерва виявлено нервові волокна (рис. 4.2 і 4.3), їх щільність не демонструвала суттєвої різниці між термінами експерименту (5, 15 і 30 доба) і щодо контролю, але були виявлені деформовані волокна з різною товщиною мієлінової оболонки. На 30 добу експерименту у сідничному нерві виявлено окремі «вільні» нейролемоцити вздовж нервових волокон. Це можна розглядати як морфологічний прояв реактивних реакцій нейролемоцитів у сідничному нерві. Як відомо, такі вільні нейролемоцити з «активованим» фенотипом з'являються при травматичному пошкодженні нерва, при розвитку первинної та вторинної дегенерації у периферійному нерві.

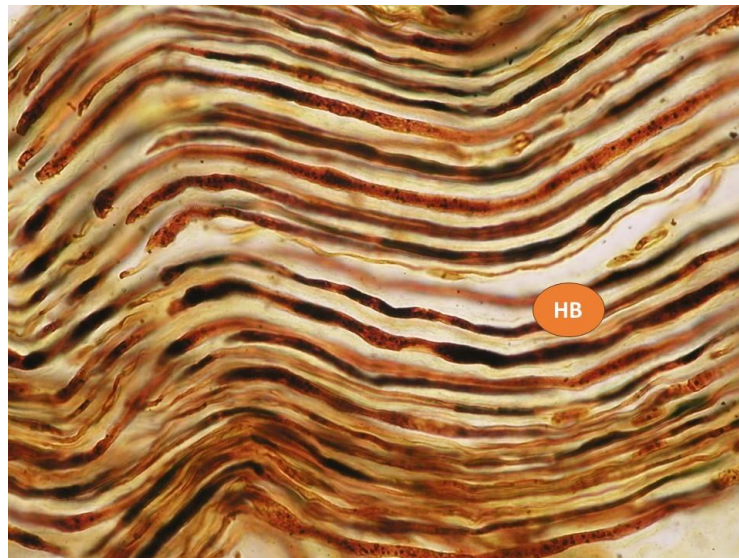


Рисунок 4.2 – Сідничний нерв на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки. Загальна морфологія нерва збережена, реєструються окремі нервові волокна у фасцикулах нерва. Примітка: нв – нервові волокна. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

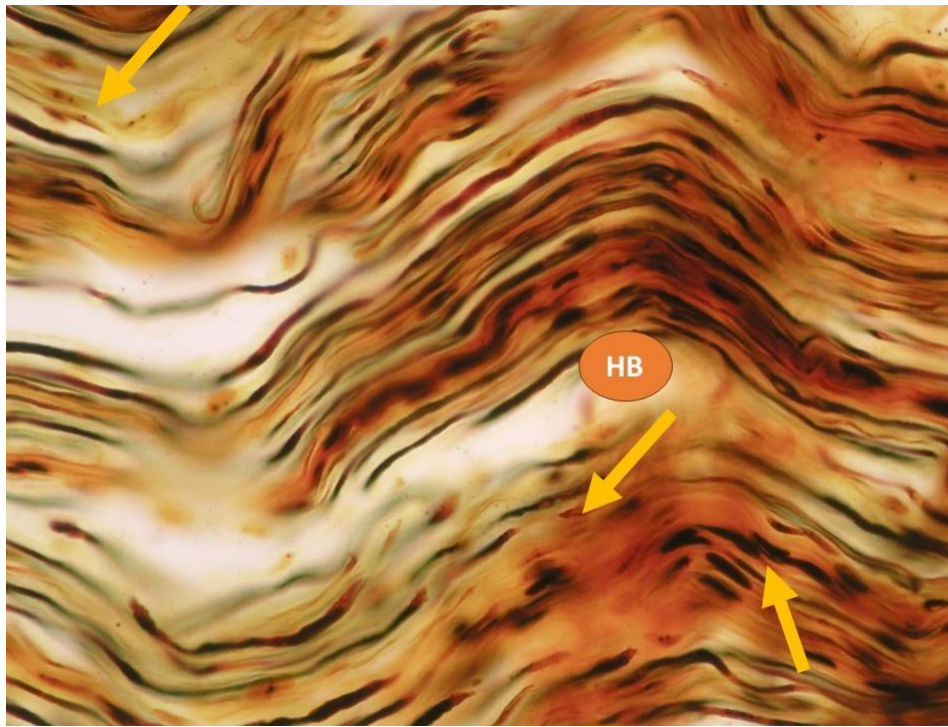


Рисунок 4.3 – Сідничний нерв на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки. У нервових волокнах реєструються «вільні» ядра нейролемоцитів. Примітка: нв – нервеве волокно; ← ядро нейролемоцита. Імпрегнація азотнокислим сріблом.

Об. 40, ок. 10.

Поява окремих нейролемоцитів може вказувати на пошкодження окремих нервових волокон і, як наслідок, ініціацію реактивно-відновної реакції гліальних клітин на пошкодження. Доказом цього є деякі ультраструктурні ознаки пошкодження нервових волокон у периферійному нерві. Так, методом електронної мікроскопії були досліджені зразки великогомілкового нерва. На 5 і 15 добу виявлено порушення щільності ламел мієліну (рис. 4.4), деформації мієліну, на 15 і 30 добу наявні некротизовані волокна (рис. 4.5). У пошкоджених мієлінових волокнах осьові циліндри могли бути не пошкоджені (з мікротрубочками, мітохондріями, везикулами), або відшаровані від мієліну. В цитоплазмі окремих нейролемоцитів виявлено атипові ламелярні (мембранні) структури, що може бути проявом дистрофічних процесів та аутофагії.

На 30 добу у великогомілкового нерві виявили невеликі ділянки, у яких нервові волокна вже не реєструвались, а були наявні тільки окремі фіброblastи, нейрoлeмoцити і залишки клітинного детриту у інтерстиційному просторі. Структура ендоневрію також зазнала змін, зокрема, не було виявлено класичної циліндричної організації фіброblastів у вигляді тубул (так звані ендоневральні трубки). Це вказує на розвиток денерваційних процесів в окремих нервових волокнах та елімінації овоїдів дегенерації до 30 доби після 6-годинної травматичної ішемії кінцівки.

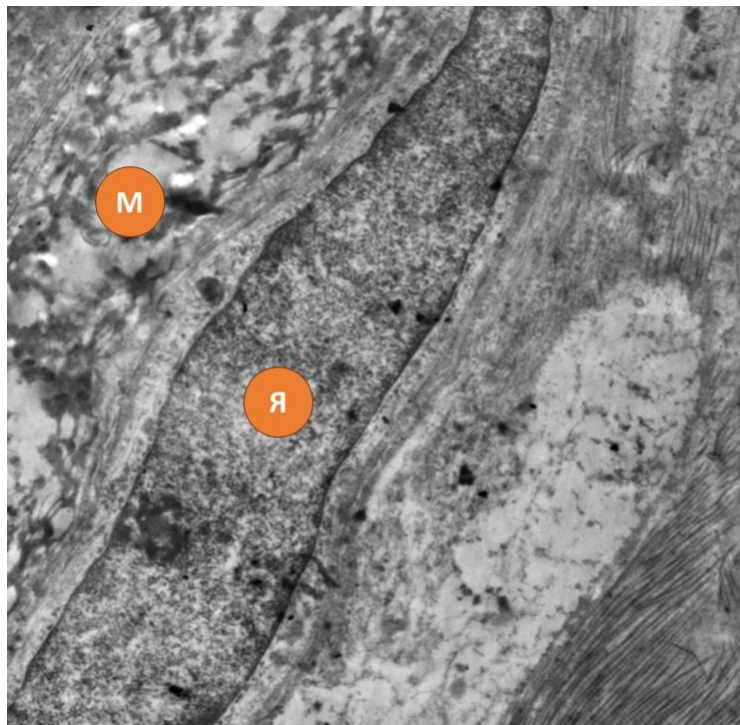


Рисунок 4.4 – Ультраструктурні зміни нервових волокон у великогомілкового нерві на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки. Пошкодження мієлінової оболонки. Примітка: я – ядро нейрoлeмoцита; м – пошкоджений мієлін.

Електронограма, зб. 45000.

Таким чином, сідничний нерв не зазнав значного пошкодження після 6-годинної травматичної ішемії кінцівки, загальна морфологія нерва залишилась збереженою і тільки на 30 добу були виявлені фокальні (незначні) структурні

зміни, що може бути пов'язано (або бути наслідком) з пошкодженням дистальних нервових стовбурів (див. рис. 4.5). Ізольовану дегенерацію окремих нервових волокон у великогомілковому нерві можна пояснити його більш поверхневою топографією у групі м'язів гомілки, тоді як сідничний нерв локалізований у міжм'язовому просторі у глибших груп м'язів стегна.

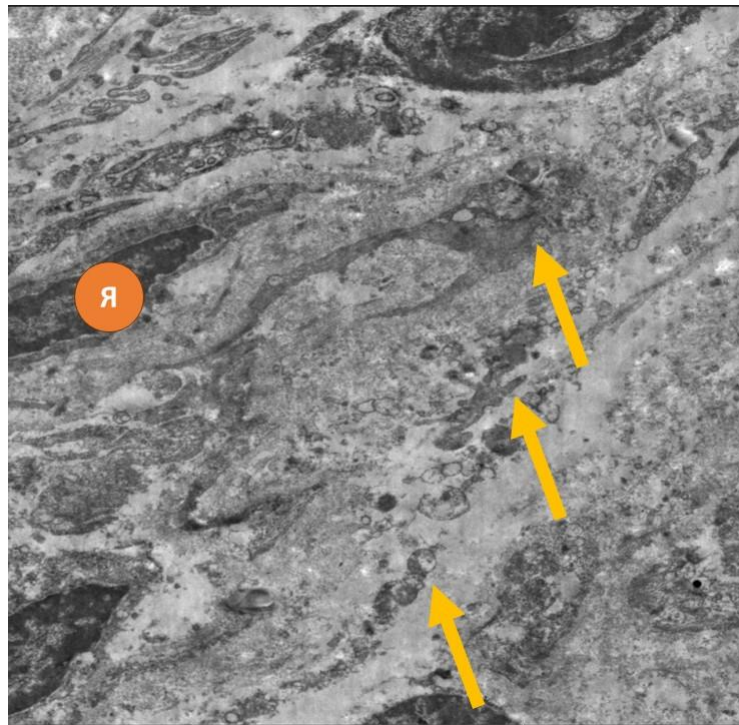


Рисунок 4.5 – Пошкодження великогомілкового нерва на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки. Ділянка нерва без нервових волокон, у позаклітинному просторі колаген та клітинний детрит. Примітка: я – ядро фібробласта; ← детрит. Електронограма, зб. 28000.

У цій роботі також були досліджені периферійні нерви тварин, яким після моделювання травматичної ішемії вводили тромбоцитарну плазму та клітинні аспірати. Так, у дослідній групі тварин, яким у групу м'язів гомілки вводили збагачену тромбоцитами плазму виявлено збережену загальноморфологічну архітектоніку сідничого та великогомілкового нерва. Значного пошкодження нервів не виявлено, ознаки некрозів, післятравматичної вторинної дегенерації,

запалення та крововиливів не реєстрували. У фасцикулах сідничного нерва нервові волокна були щільно орієнтовані (рис. 4.6), їх щільність візуально не відрізнялась від контрольного нерва.

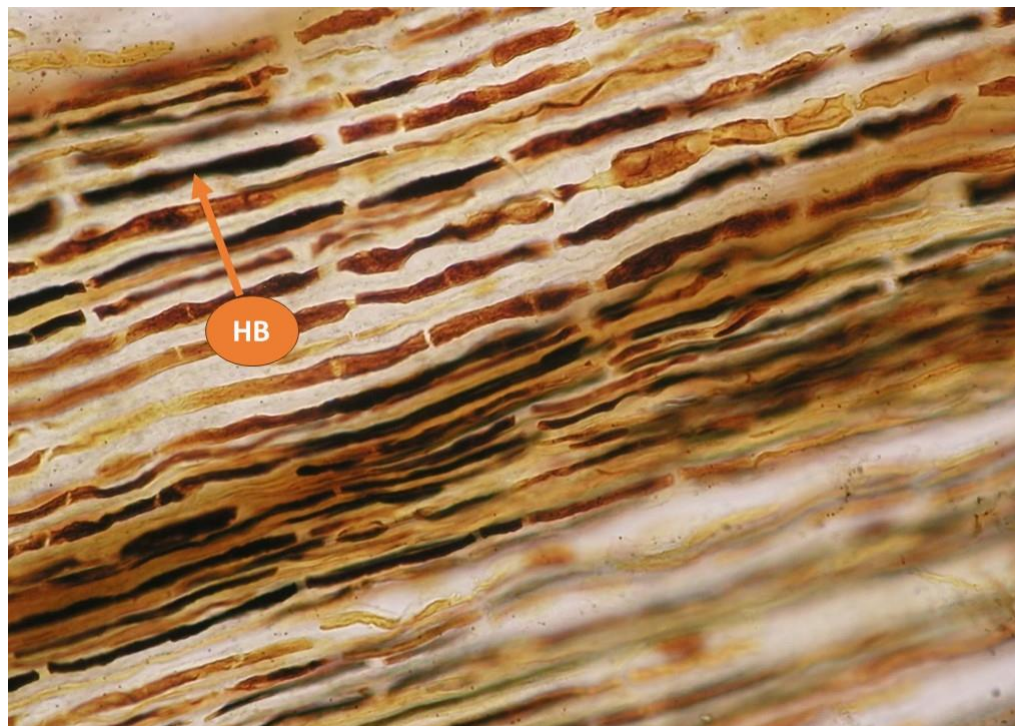


Рисунок 4.6 – Сідничний нерв на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення тромбоцитарної плазми. Щільність нервових волокон у фасцикулах нерва не змінилась. Примітка: нв – нервеве волокно. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

У великогомілковому нерві тільки на 30 добу виявлені окремі нервові волокна з пошкодженою мієліною оболонкою (розшарування і деформація ламел мієліну) (рис. 4.7). Також реєстрували нервові волокна з атрофією осьового циліндра, що є ознакою дегенеративних змін і редукції нервових волокон. Але такі нервові волокна були поодинокими і тому ці зміни не мали суттєвого впливу на загальну структуру великогомілкового нерва.

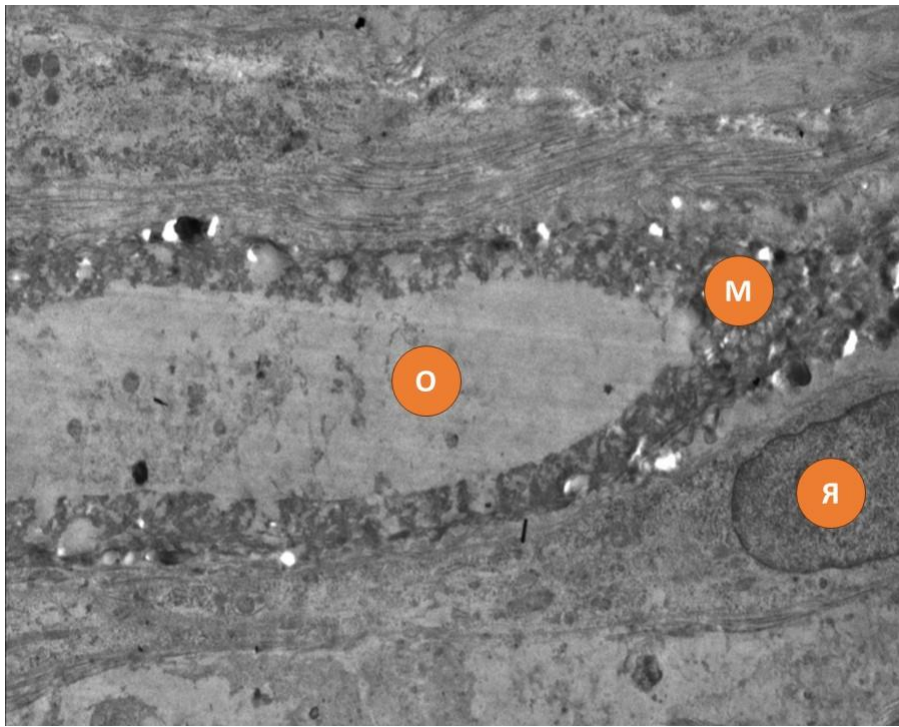


Рисунок 4.7 – Некротично-дистрофічні зміни мієлінового волокна на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення тромбоцитарної плазми. Деструкція осьового циліндра і мієлінової оболонки. Примітка: я – ядро нейролемоцита; м – пошкоджений мієлін; о – осьовий циліндр. Електроннограма, зб. 26000.

У групі з введенням аспірату клітин кісткового мозку у терміни з 5-ї до 30-ї доби експерименту суттєвих морфологічних змін сідничного нерва не виявлено (рис. 4.8). Демієлінізацію і некроз окремих нервових волокон підтверджено тільки у досліджених зразках великогомілкового нерва на 30 добу (рис. 4.9), хоча ультраструктурні зміни мієлінової оболонки реєстрували й на 5 добу. Зміни мієлінових волокон були неспецифічними і часто дифузними, тобто залежними від локалізації у різних фасцикулах нерва. У таких фасцикулах реєстрували ендоневральні канали з «вільними» нейролемоцитами (рис. 4.10). Одержані дані вказують, що введення у м'язи гомілки аспірату клітин кісткового мозку не

позначилось на морфології периферійних нервів кінцівки, що є хорошим результатом у дослідженні небажаних наслідків дії клітинних технологій.



Рисунок 4.8 – Сідничний нерв на 15 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення концентрату клітин кісткового мозку. Морфологія нерва збережена, щільність нервових волокон не порушена. Примітка: нв – нерве волокно.

Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

У групі з аспіратом жирової тканини гострої дегенерації нервових волокон у сідничному та великогомілковому нервах також не підтверджено. На поздовжніх гістологічних зрізах нервів на 5 добу експерименту спостерігалась істотна відмінність товщини осьових циліндрів у різних нервових волокнах (рис. 4.11). Це не можна вважати проявом дегенеративних змін, оскільки цілісність нервових волокон була збереженою і овоїди дегенерації не виявлялись. Але це може бути наслідком компресійного пошкодження. «Вільні» нейролемоцити не реєстрували, що може свідчити про менше пошкодження нервових волокон після травматичної ішемії, але разом з тим явні морфологічні ознаки дегенерації

нервових волокон також були відсутні. Мали місце тільки демієлінізація і дегенерація поодиноких волокон на рівні великогомілкового нерва, тобто дистальніше рівня компресійної ішемії. Іншим проявом пошкодження нерва є відповідні ознаки у клітинах або інтерстиційному просторі ламелярних структур, що може бути пов'язано з процесами аутофагії у пошкоджених клітинах (рис. 4.12). Тобто периферійні нерви кінцівки не зазнали значного пошкодження після травматичної ішемії кінцівки, а виявлені зміни були ізольованими (фокальними) і не призвели до розвитку вторинної дегенерації та нейропатії. Пошкодження нейролемоцитів і деяких нервових волокон у великогомілковому нерві можна пояснити більш поверхневим анатомо-топографічним розташуванням порівняно із сідничним нервом.

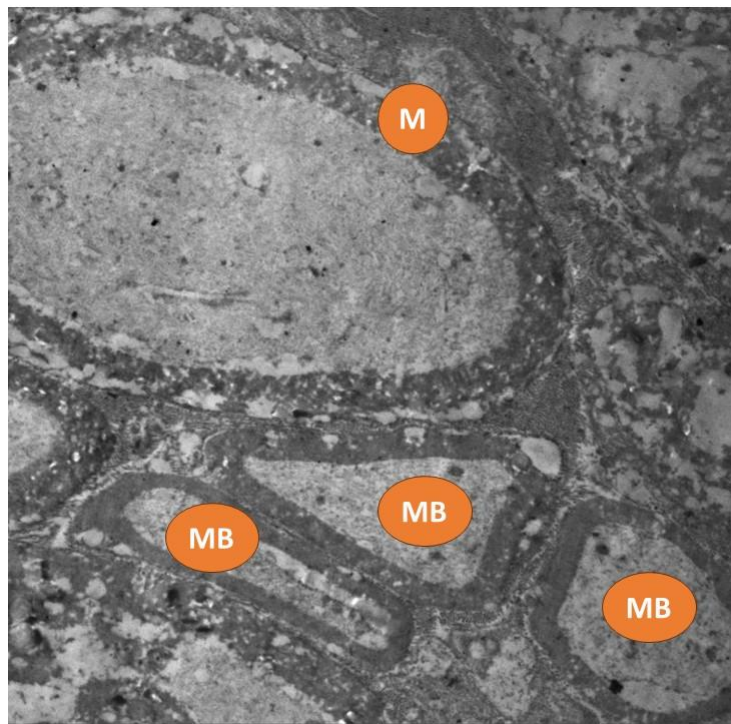


Рисунок 4.9 – Некротично-дистрофічні зміни мієлінового волокна на 5 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення концентрату клітин кісткового мозку. Дистрофічні зміни мієлінової оболонки. Примітка: м – пошкоджений мієлін; мв – структурно неушкожене мієлінове волокно. Електронограма, зб.

30000.

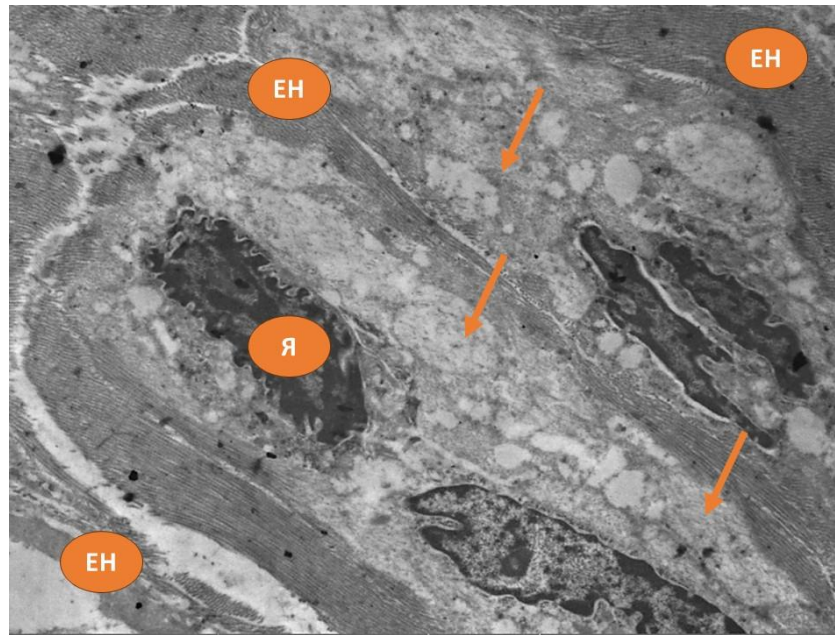


Рисунок 4.10 – Дегенерація нервових волокон на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення концентрату клітин кісткового мозку. Примітка: я – ядра нейролемоцитів; ен – ендоневрій; ← клітинний детрит. Електронограма, зб. 28000.

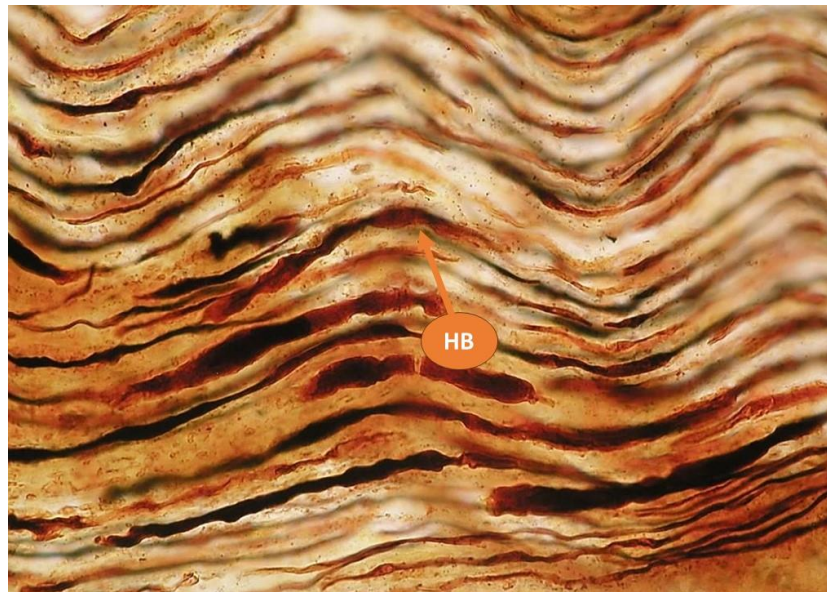


Рисунок 4.11 – Сідничний нерв на 5 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення аспірату жирової тканини. Щільність нервових волокон збережена, але товщина осьових циліндрів суттєво відрізняється між волокнами. Примітка: нв – нервово волокно. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

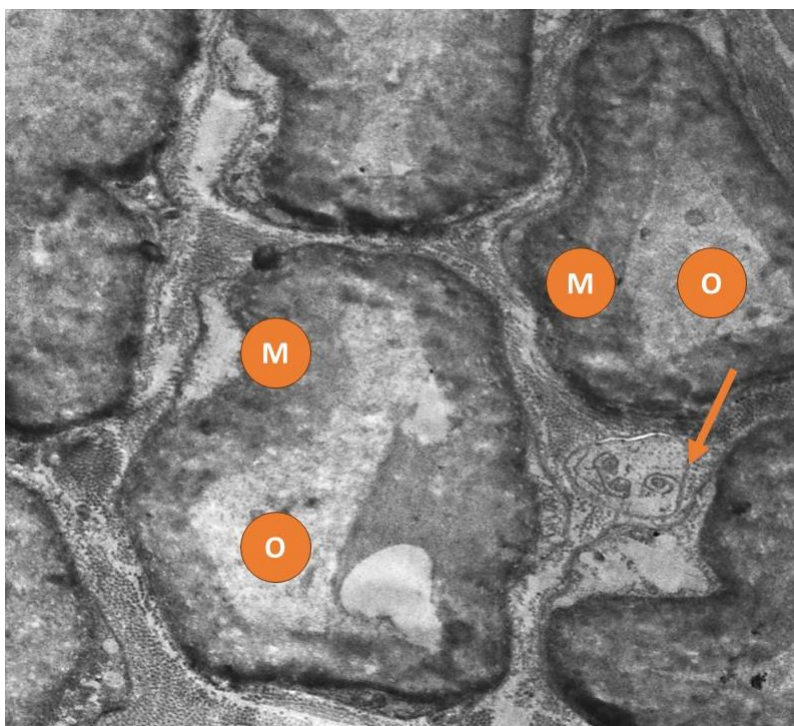


Рисунок 4.12 – Структурно збережені нервові волокна на 30 добу після травматичної ішемії кінцівки та введення аспірату жирової тканини. Атипові ламелярні структури між окремими нервовими волокнами. Примітка: о – осьовий циліндр; м – мієлінова оболонка; ← ламелярні тільця.

Електронограма, зб. 28000.

Для статистичної оцінки щільності нервових волокон у сідничному нерві дослідних груп тварин було застосовано методи морфометрії. Було визначено кількість волокон у гомологічних ділянках нерва у різні терміни після моделювання травматичної ішемії. Результати морфометрії наведено на рис. 4.13. Як видно з графіка, на деякі терміни у дослідних тварин відмічено тенденцію до зменшення кількості нервових волокон, що у жодній з експериментальних груп та на жоден з трьох термінів спостережень не було встановлено із статистично значущою різницею.

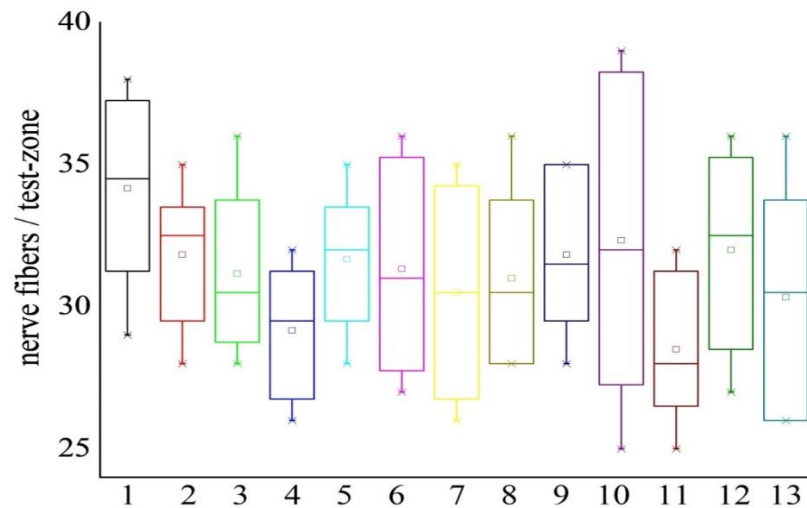


Рисунок 4.13 – Середня кількість нервових волокон у тест-зонах сідничного нерва після травматичної ішемії кінцівки. Примітка: 1 – контроль; 2, 3 і 4 – ішемія на 5, 15 і 30 добу; 5, 6 і 7 – ішемія+тромбоцитарна плазма на 5, 15 і 30 добу; 8, 9 і 10 – ішемія+концентрат клітин кісткового мозку на 5, 15 і 30 добу; 11, 12 та 13 – ішемія+аспірат жирової тканини на 5, 15 і 30 добу.

Висновок до розділу. 6-годинна турнікетна ішемія кінцівки викликала значне пошкодження скелетних м'язів з розвитком некрозу м'язової тканини у поверхневих міонах м'язів та гіпотрофію інших, при цьому периферійні нерви, які у супроводі магістральних судин (нервово-судинного пучка) локалізовані у міжм'язовому просторі, залишились майже не ушкодженими. Введення у м'язову тканину досліджуваних засобів також не мало небажаних наслідків щодо морфології периферійних нервів кінцівки.

Публікації до Розділу 4:

Pidlisetskyu, A., Savosko, S., Dolhopolov, O., Makarenko, O. (2021). Peripheral nerve lesions after a mechanically induced limb ischemia. *Georgian Medical News, Jan* (310), 165-169.

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ РЕАКТИВНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНОГО ПЕРИОДУ ІШЕМІЧНОЇ КОНТРАКТУРИ ТА МОЖЛИВІСТЬ ВПЛИВУ НА НЕКРОТИЗОВАНІ М'ЯЗИ

5.1. Результати досліджень впливу концентрату тромбоцитарної плазми на ішемічні зміни скелетних м'язів

За результатами гістологічних досліджень у м'язах гомілки тварин з ішемією та за умови застосування тканинних технологій виявлено структурні порушення загальної морфології м'язової тканини, які включали зміни у сполучній тканині м'язів, кровоносних судинах та м'язових волокнах. Як і у групі з ішемією, після введення концентрату тромбоцитарної плазми встановлено пошкодження, реорганізацію і зміну щільності сполучної тканини фасції та стромальних елементів м'язів, у більшій мірі у епімізії та перимізії (рис. 5.1). На 5 добу після ішемії фасція характеризувалась розволокненням; між структурними елементами (фібробласти, пучки колагену) виявлено збільшений інтерстиційний простір, реєстрували значне збільшення щільності фібробластів. Фібробласти заповнювали проміжки між фасцією та пошкодженими міонами, мігрували у міони і заміщували некротизовані м'язові волокна. У сполучній тканині виявлено значну кількість продуктів гемолізу у інтерстиційному просторі, у фасції, між м'язовими волокнами. Продукти розпаду некротизованих клітин і гемолізу активно фагоцитували макрофаги. Щільність м'язових волокон суттєво зменшилась, що пов'язано з їх некрозом і заповненням уражених ділянок м'язової тканини сполучною. Це супроводжувалось появою запального інфільтрату, у складі якого клітини моноцити, макрофаги, лімфоцити (рис. 5.2).

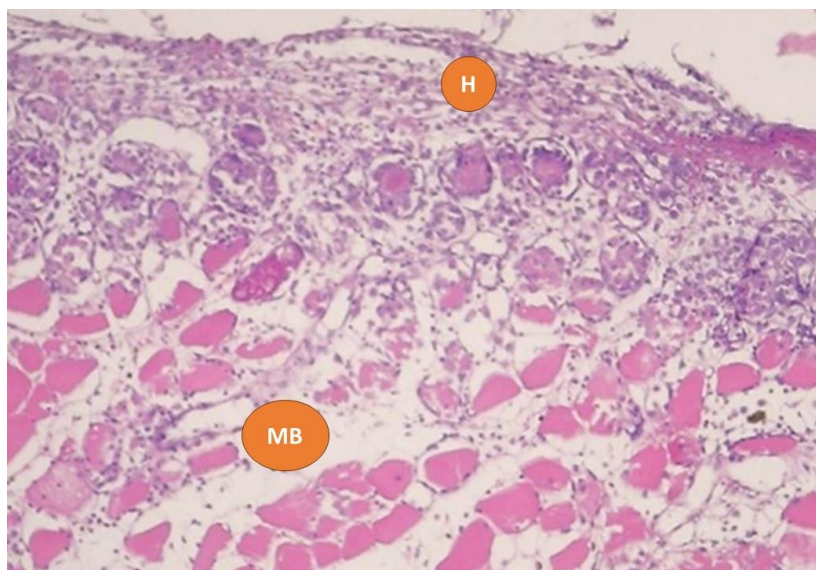


Рисунок 5.1 – Некроз і запалення у скелетних м'язах гомілки кролів на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Некроз і редукція кількості м'язових волокон.

Примітка: н – ділянки некрозу; мв – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 10.

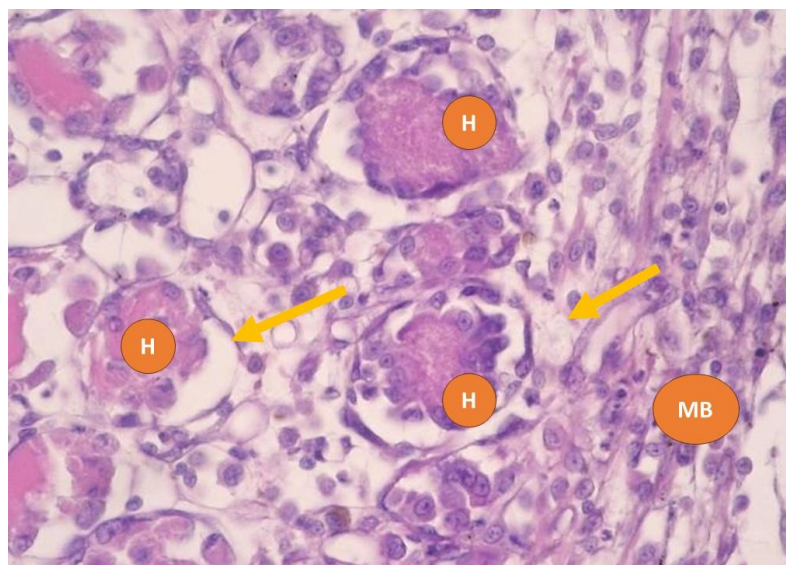


Рисунок 5.2 – Некроз м'язових волокон на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Реєструються структурно порушені елементи ендомізій. Примітка: н – некроз м'язових волокон; мв – м'язове волокно; ← ендомізій. Гематоксилін з еозином.

Об. 40, ок. 10.

Зміни у кровоносній системі скелетних м'язів після застосування клітинних технологій мали тенденцію, подібну до тої яку описано у групі з ішемією. На 5 добу виявлено значну кількість судин в стані некрозу, тромбозу і лізису формених елементів крові. Навколо окремих судин реєстрували фокальні скупчення макрофагів і лейкоцитів. Паравазальна сполучна тканина була розшарована, структурно порушена, що є свідченням порушення перфузії у судинах та ішемії (рис. 5.3). Цілісність стінки судин великого та середнього калібру не порушена, але на 15 добу виявлено ділянки геморагічного просочення, що пов'язано з наслідками ангіонекрозу, порушення цілісності окремих судин мікроциркуляторного русла (рис. 5.4). У стінці судин встановлено істотне зменшення кількості ядер клітин, що є доказом некрозу клітин у структурних оболонках судин. На 30 добу виявлено більшу щільність новоутворених судин малого і середнього калібру (артерії, артеріоли, вени, венули).

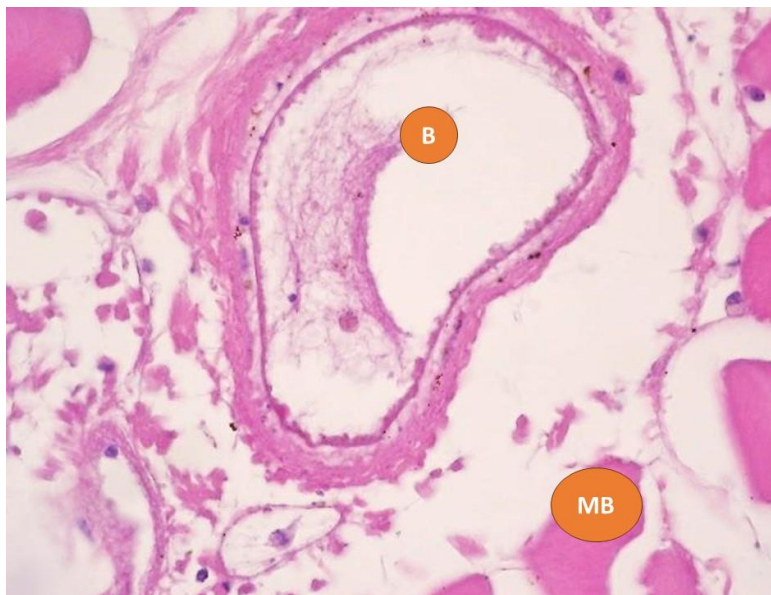


Рисунок 5.3 – Пошкоджена вена у скелетних м'язах на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Некробіотичні зміни стінки вени. Примітка: в – вена; мв – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

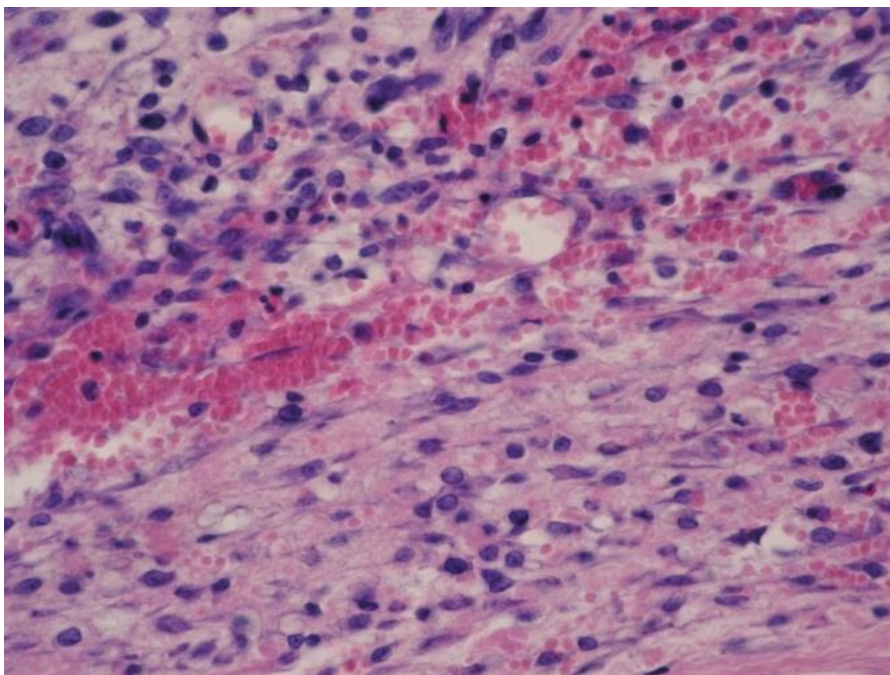


Рисунок 5.4 – Запальний інфільтрат та геморагічне просочення ділянки некрозу у скелетних м'язах на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Гематоксилін з еозином.

Об. 40, ок. 10.

На 15 добу після ішемії щільність новоутвореної сполучної тканини збільшилась у всіх досліджених зразках групи, фокальне геморагічне просочування м'язу також реєстрували. Реєстрували безклітинні ділянки з великою кількістю колагену, що було подібне до формування волокнистої сполучної тканини. Це найімовірніше пов'язано з елімінацією на 15 добу після ішемії клітинного детриту та розвитком рубцевих змін у цих ділянках м'язової тканини.

На 15 добу після введення у м'язи гомілки тромбоцитарної плазми, одночасно з гіпотрофією збережених м'язових волокон виявлено і ознаки регенеративного процесу (рис. 5.5). Морфологічні особливості гіпо- та атрофії м'язових волокон були подібними до тих, що описані у групі з ішемією без корекції, але виявлено деякі відмінності. Так, на тлі вираженої гіпотрофії

м'язових волокон, збільшення інтерстиційного простору та новоутвореної сполучної тканини, в окремих м'язових волокнах встановлено появу додаткових міоядер, групи яких (часто стрічками) були орієнтовані вздовж цих одиниць. Поява таких волокон може бути пов'язана як з активацією ендогенних регенеративних процесів, так і залученням у відновлення м'язових волокон супутніх міосателітоцитів, які на тлі ішемічного пошкодження набули “бластоподібного” фенотипу. Такі клітини реєстрували і на 30 добу після пошкодження м'язів кінцівки. На ультраструктурному рівні такі клітини містять велику кількість цистерн ендоплазматичної сітки, гранулярну цитоплазму, у ядрі домінує еухроматин (рис. 5.6). Доказом того, що відбувається регенерація може бути те, що вздовж пошкоджених м'язових волокон виявлено поодинокі клітини у фазах мітозу, тобто відбувалась клітинна регенерація, проліферація у ділянках пошкодження (рис. 5.7).

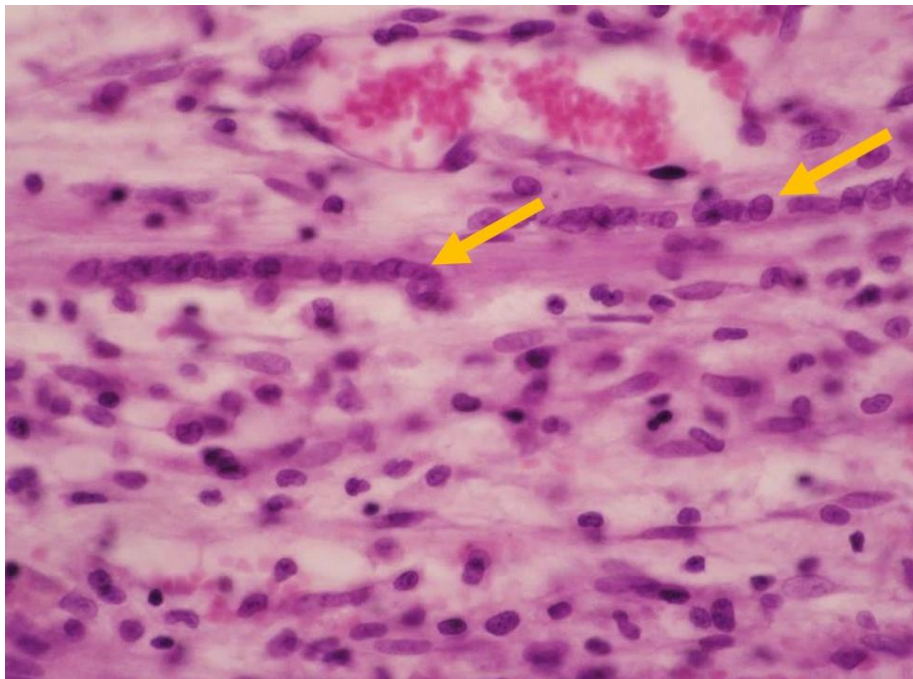


Рисунок 5.5 – Формування групою міоядер структур подібних до міотубул на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Примітка: ← міоядра. Гематоксилін з еозином.

Об. 40, ок. 10.

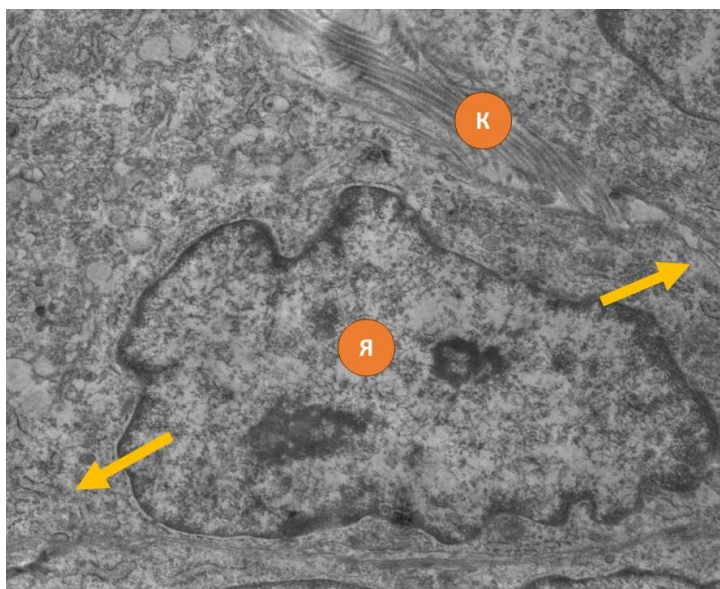


Рисунок 5.6 – Ультраструктура клітин з «бластоподібним» фенотипом. Термін спостереження - 15 доба після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Примітка: я – ядро; к – колаген; ← цистерни ендоплазматичної сітки. Електроннограма, зб. 37000.

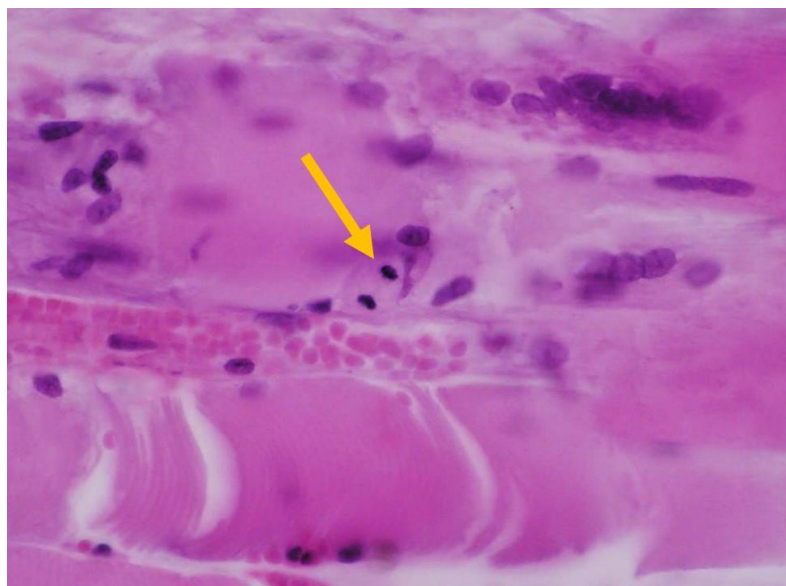


Рисунок 5.7 – Мітоз клітин навколо пошкоджених м'язових волокон на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Примітка: ← мітоз. Гематоксилін з еозином.

Об. 40, ок. 10.

На 30 добу після введення концентрату тромбоцитарної плазми гістологічна будова фасції та субфасціальної сполучної тканини характеризувалась більшим ущільненням порівняно до терміну 5 і 15 діб після ішемії. Також ці зміни не мали поліморфний характер як при ішемії без введення клітинних субстратів. Виявлено значну кількість білкових фібрилярних елементів та фібробластів, клітини у мітозах вже не реєстрували. Це свідчить про зменшення темпів утворення сполучної тканини у відповідь на механічне та ішемічне пошкодження м'язів гомілки. У субфасціальній ділянці у ділянках з некротизованими м'язовими волокнами продовжували виявляти м'язові волокна з додатковими міоядрами (у центрі і периферії м'язового волокна), тобто явища регенерації відбувались, як і на 15 добу експерименту (рис. 5.8). У глибоких міонах, які були менш пошкоджені, м'язові волокна залишились відносно щільно орієнтованими, вони були більшого діаметру порівняно з одиницями поблизу фасції. Це свідчить про затримку гіпотрофії у глибоких ділянках скелетних м'язів на 30 добу після ішемії та введення тромбоцитарної плазми.

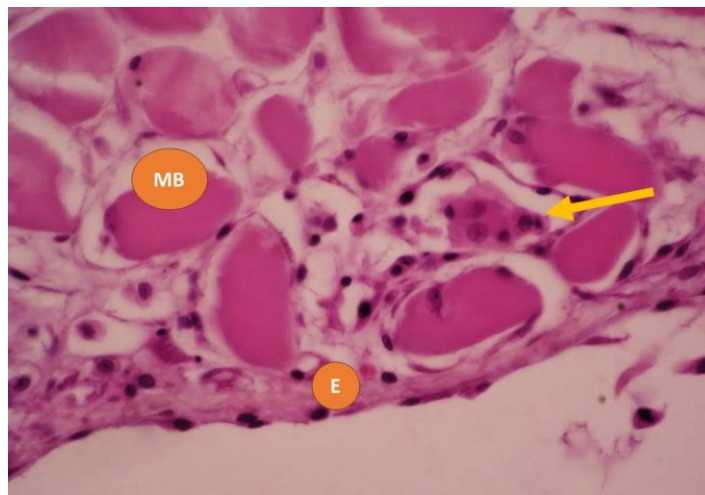


Рисунок 5.8 – Структурно пошкоджені м'язові волокна на 30 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Некроз групи м'язових волокон. Примітка: мв – м'язове волокно; е – епімізій. ← некротизоване м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

5.2. Результати досліджень впливу концентрату клітин кісткового мозку на ішемічні зміни скелетних м'язів

У групі з аспіратом кісткового мозку на 5 добу після моделювання травматичної ішемії встановлено морфологічні зміни подібні до тих які спостерігались у попередніх групах. Виявлено ділянки некрозу м'язової тканини (рис. 5.9) та ушкодження кровоносних судин (рис. 5.10). У субфасціальних міонах виявлено некротизовані м'язові волокна, їх фрагментацію, порушення ендомізію і появу макрофагів і лімфоцитів, що є ознакою розвитку запалення. У «глибоких» міонах м'язові волокна мали менший діаметр від контрольних, але зберігали поперечну посмугованість. Ознак активації відновлення не спостерігали.

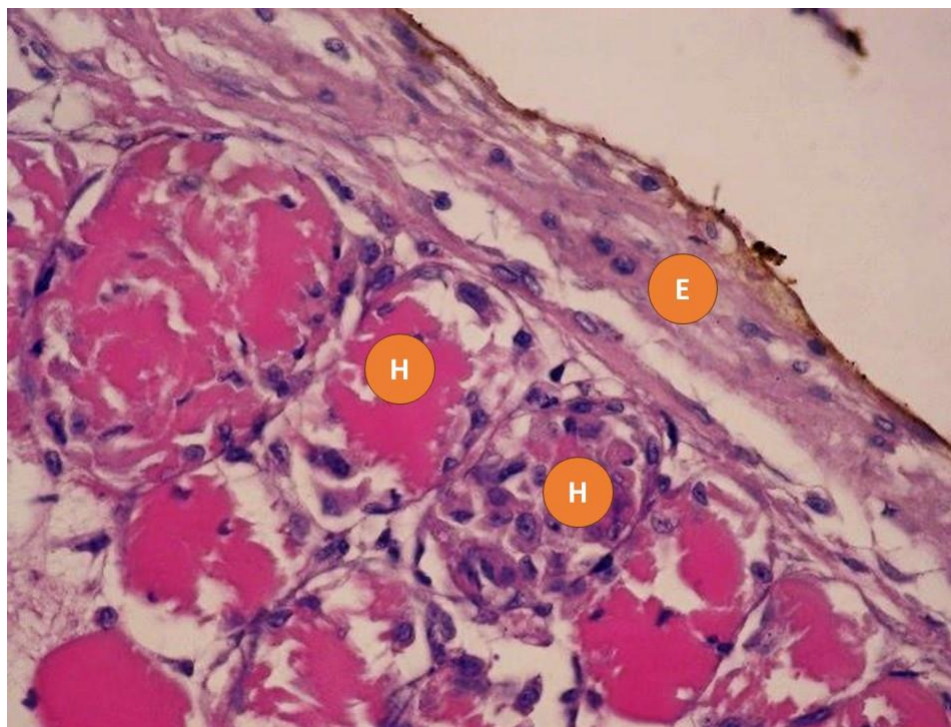


Рисунок 5.9 – Некроз м'язових волокон під епімізій м'язу гомілки на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Примітка: н – некроз м'язових волокон; е – епімізій.

Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

У деяких кровоносних судинах великого і середнього калібру, між глибокими м'янами у м'язі, виявлено скупчення фібрину, а у стінці судини - зменшення кількості забарвлених ядер, що вказує на некротичні процеси у стінці досліджених судин. Судини, які локалізовані у перимізії, стазовані, їх стінка структурно порушена, формені елементи крові лізовані.

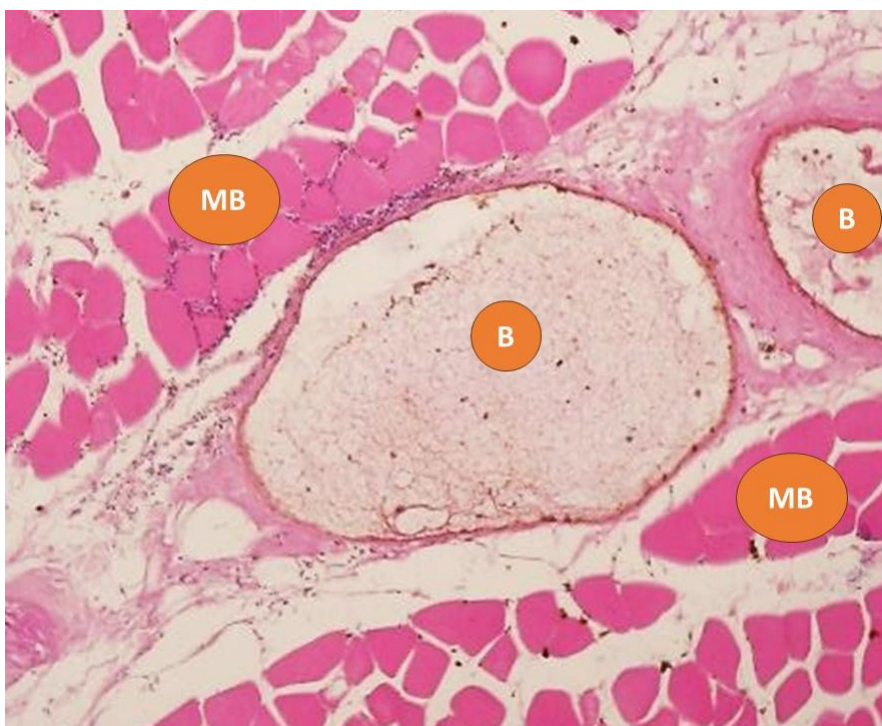


Рисунок 5.10 – Структурні зміни кровоносних судин у скелетних м'язах гомілки на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Різко дилатована вена із фібриновим вмістом.

Примітка: в – вена; мв – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 10.

На 15 добу судини перимізії різко кровонаповнені (особливо венули), відмічено деяке збільшення щільності судин, що вказує на післятравматичну регенерацію судин та відновлення кровотоку у судинах перимізії. Разом з тим, виявлено окремі ділянки геморагічного просочення. На 30 добу також виявлено додатковий ангіогенез у субфасціальній сполучній тканині.

На мікроскопічному рівні щільність новоутвореної сполучної тканини візуально збільшилась. Одночасно з цим, на 15 добу у ділянках некрозу та атрофії м'язів встановлено активні регенеративні процеси (рис. 5.11). Морфологічними ознаками відновлення були збільшення кількості міоядер у м'язовому волокні, збереження та/або відновлення поперечної посмугованості. Слід відзначити, що ці ознаки не є специфічними, щоб їх можна було пов'язувати безпосередньо з ефектом введення концентрату клітин аспірату кісткового мозку. Проте поява стрічкоподібних груп міобластів, що особливо чітко підтверджено при ультраструктурному дослідженні, може бути свідченням стимуляції або підтримки реактивно-відновних процесів у цій групі (рис. 5.12 і 5.13).

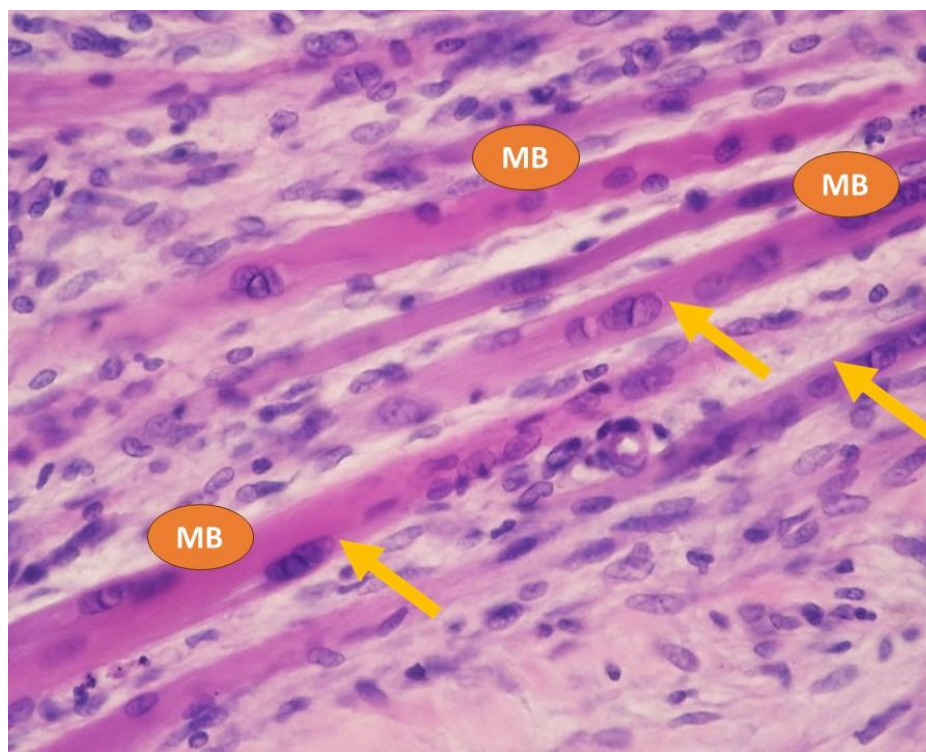


Рисунок 5.11 – Гіпотрофія м'язових волокон у скелетних м'язах гомілки на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Збільшення кількості міоядер. Примітка: ← міоядра; мв – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

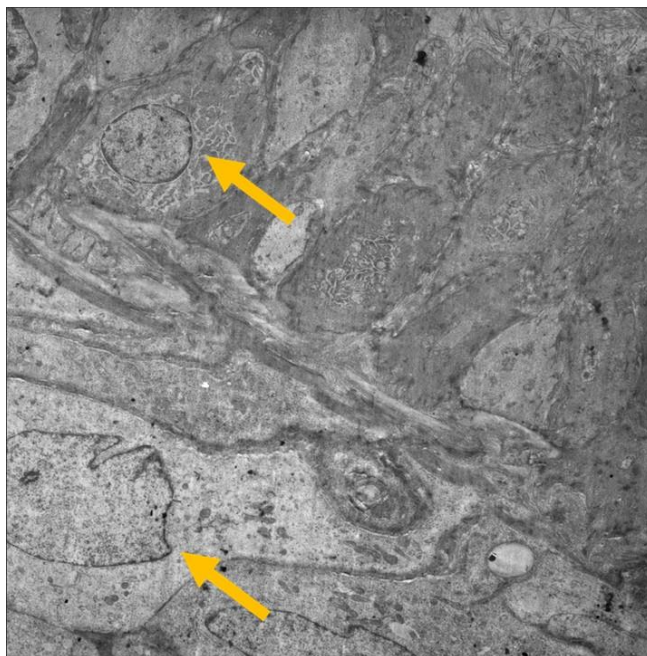


Рисунок 5.12 – Група клітин з «бластоподібним» фенотипом на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Збільшення кількості міоядер. Примітка: ← міоядра.

Електронограма. Зб. 10000.

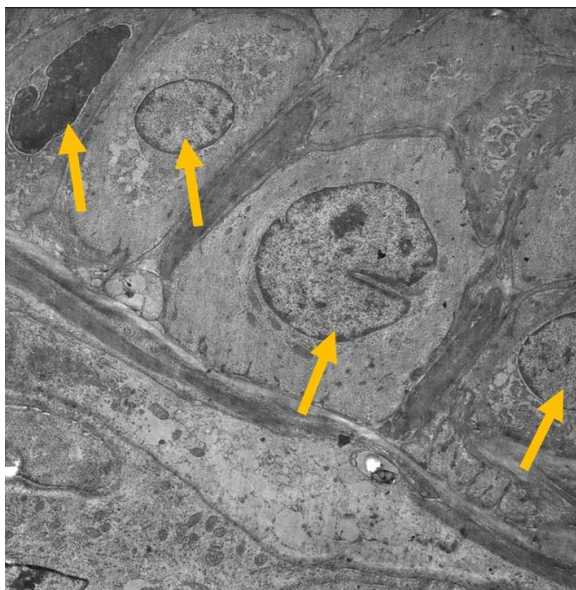


Рисунок 5.13 – Група клітин з «бластоподібним» фенотипом на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Збільшення кількості міоядер. Примітка: ← міоядра.

Електронограма. Зб. 25000.

На 30 добу після введення клітин кісткового мозку морфологічні зміни пошкоджених м'язів можна охарактеризувати як такі, що зазнали остаточного завершення формування рубцевої тканини. Між фасцією та новоутвореною сполучною тканиною вже не можна побачити різницю. Сполучна тканина замістила ділянки некрозу і пронизує міони з ознаками атрофії. Також виявлено ділянки значної атрофії м'язових волокон із заміщенням м'язової тканини на рубцеву сполучну тканину (рис. 5.14). У глибоких ділянках м'язів сполучна тканина зосереджена на рівні перимізію, ендмізій у нешкоджених міонах візуально не зазнав значних змін.

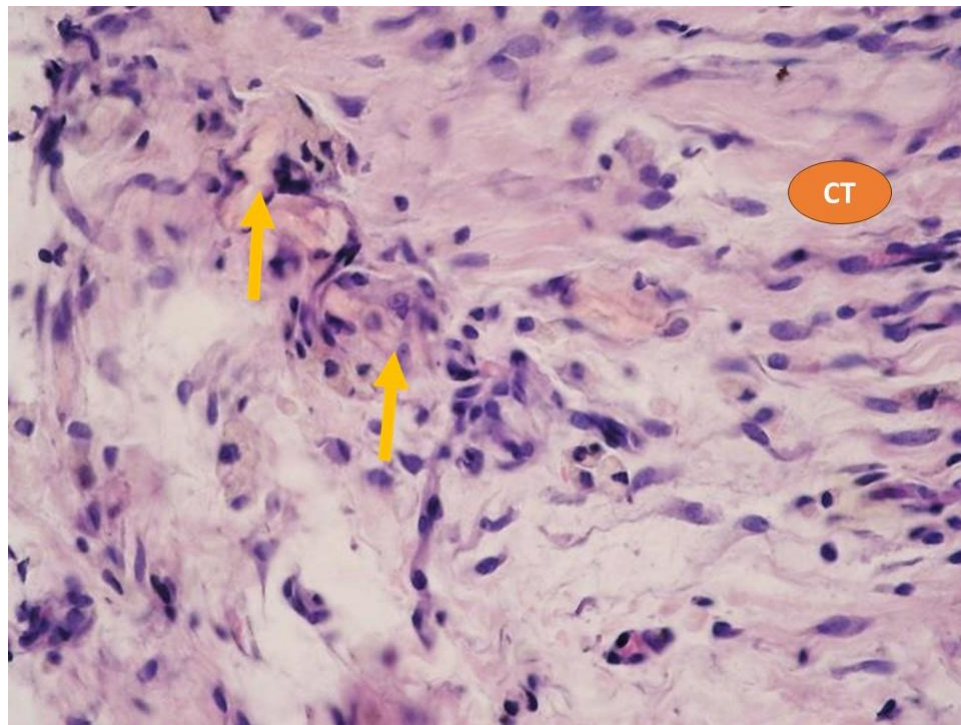


Рисунок 5.14 – Атрофія м'язових волокон на 30 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку.

Примітка: ← атрофовані м'язові волокна; СТ – сполучна тканина.

Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

Разом з тим, на межі з рубцем виявлено групи пошкоджених м'язових волокон, як з ознаками атрофії, так і регенерації (супутньо реєструються міобласти) (рис. 5.15). Описані групи м'язових волокон не зустрічаються у субфасціальних ділянках, оскільки на 15 добу ця зона майже повністю заповнена сполучною тканиною і у ній сформувалася рубцева тканина.

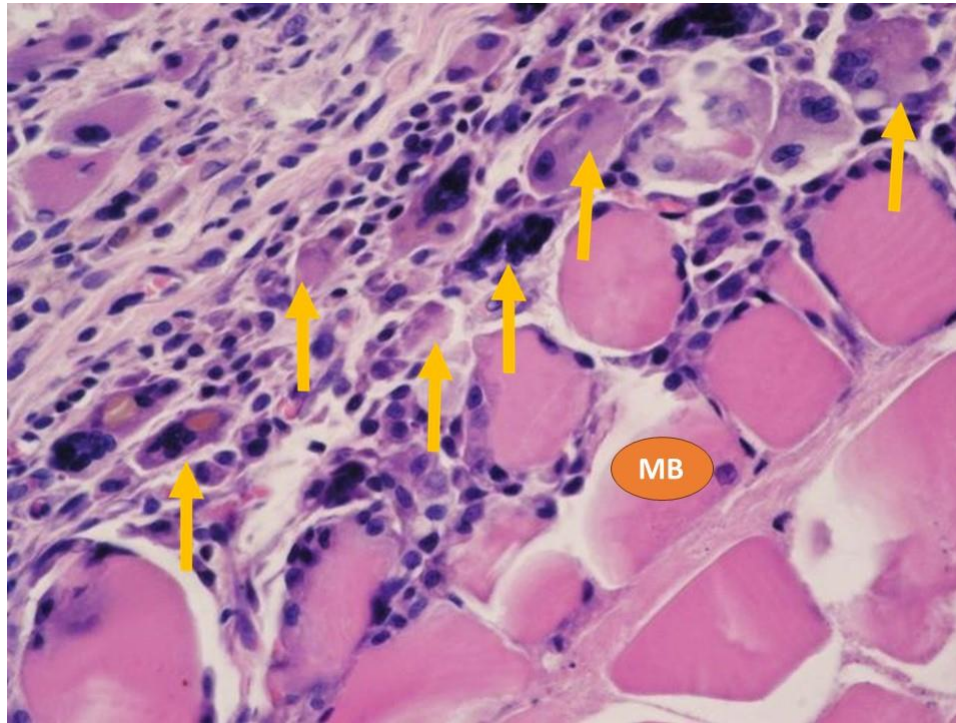


Рисунок 5.15 – Некроз м'язових волокон з інфільтрацією на 30 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Примітка: ← некроз м'язових волокон.

Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

У структурно збережених м'язових волокна на ультраструктурному рівні реєстрували мультиламелярні тільця (різної варіабельності) (рис. 5.16). Такі атипіві структури можуть бути наслідком пошкодження білкових та мембранних структур, які залученні у формування цистерн саркоплазматичної сітки та т-трубочок і є проявом дистрофічних змін після ішемії.

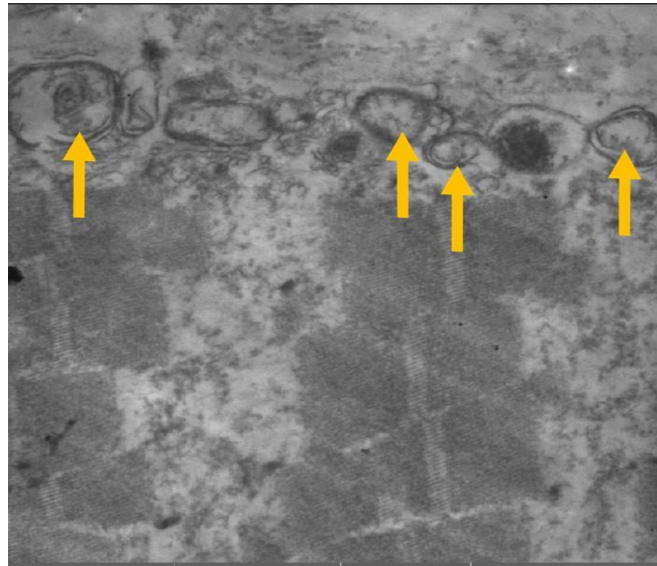


Рисунок 5.16 – Ультраструктурні порушення у м'язовому волокні на 30 добу після моделювання травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Порушена організація міофібрил, мультиламелярні тільця.

Примітка: ← атипові тільця. Електроннограма. Зб. 60000.

Проте на відміну від проявів у групі з ішемією у субфасціальних ділянках атрофованих м'язів реєстрували активацію ангиогенезу, а у глибоких м'язах - активацію до відновлення, що сприяло поліпшенню стану ішемічно ушкоджених м'язових волокон.

5.3. Результати досліджень впливу аспірату клітин жирової тканини на ішемічні зміни скелетних м'язів

У групі з аспіратом жирової тканини виявлено більш виражене порушення сполучної тканини перимізію і внутрішнього шару фасції. Відбулось суттєве збільшення кількості сполучної тканини під фасцією, спостерігається втрата м'язових волокон і цілісності окремих кровоносних судин, геморагічне просочування м'язу еритроцитарною масою та заповнення новоутвореною фіброзною тканиною ділянок атрофії.

У всі терміни спостереження виявлено новоутворені судини малого калібру – дрібні артерії, артеріоли, венули. Ангіогенез у більшій мірі реєстрували у

ділянках новоутвореної сполучної тканини, яка оточує дозу введення аспірату. Остання характеризується інфільтрацією макрофагів і лейкоцитів, реакцією запалення (рис. 5.17). Тому зроблено висновок, що реакція ангиогенезу у групі з аспіратом жирової тканини є відповіддю сполучної тканини на введення аспірату та формування капсули (інкапсуляції аспірату). Поява великої кількості клітин моноцитарного ряду, активних макрофагів також вказує на активну участь цих клітин в утилізації клітинного детриту. Слід зазначити, що при введенні аспірату жирової тканини відбувається потрапляння у м'язу тканину значної кількості пошкоджених клітин. Цим можна пояснити розвиток значної гіпотрофії м'язових волокон та заміщення м'язової тканини новоутвореною сполучною тканиною, особливо у ділянках запальних інфільтратів та інкапсуляції. Такі зміни реєстрували у всі терміни експерименту, запальну інфільтрацію спостерігали на 15 і 30 добу (рис. 5.18 і 5.19).

Значний обсяг новоутвореної тканини утворився у перимізії, де локалізовані нервові стовбури. Морфологічний стан периферійних нервів характеризувався збільшенням щільності нейролемоцитів (подібно до початкових етапів регенерації нерва), що вказує на розвиток вторинної дегенерації у нервах. У віддаленні від ділянки введення аспірату м'язові волокна характеризувалися збереженою поперечною посмугованістю і активацією міо ядер. Тобто, як і у попередніх досліджених групах з ішемією кінцівки, виявлено спільні морфологічні риси розвитку структурних порушень. Ці зміни полягають у некрозі і атрофії субфасціальної групи міонів, розвитку рубцевої сполучної тканини і запалення, тоді як на межі з неушкодженими глибокими міонами спостерігаються реактивно-відновні явища. Останні полягають у появі додаткових клітин-сателітів вздовж пошкоджених м'язових волокон, появі додаткових міо ядер (головним чином всередині цитоплазми волокон) і формуванні окремих міотубул (рис. 5.20).

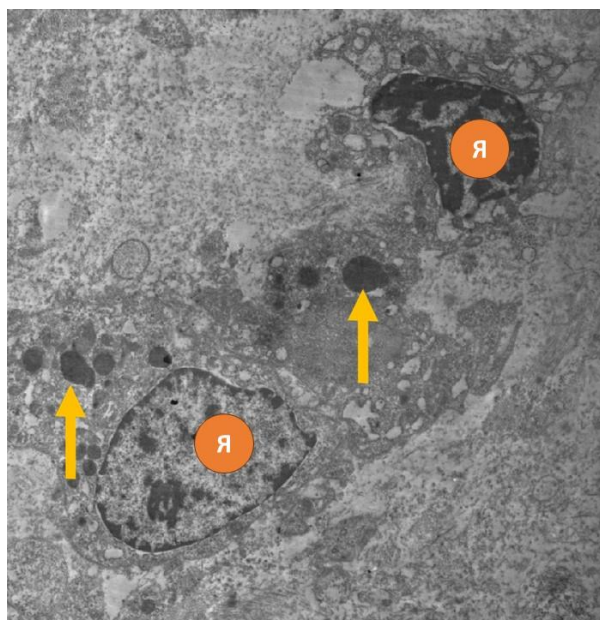


Рисунок 5.17 – Макрофаги у ділянці некрозу м'язової тканини на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення аспірату жирової тканини. Збільшення кількості міоядер. Примітка: я – ядро макрофага; ← фагосоми. Електронограма. Зб. 22000.

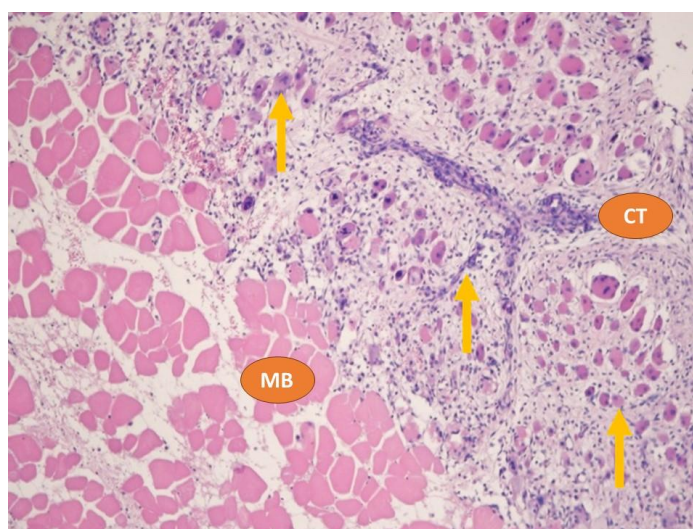


Рисунок 5.18 – Структурні зміни у м'язах гомілки кролів на 15 добу після ішемії та введення аспірату жирової тканини. Примітка: мв – м'язові волокна; ← некроз м'язових волокон; ст – сполучна тканина.

Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 10.

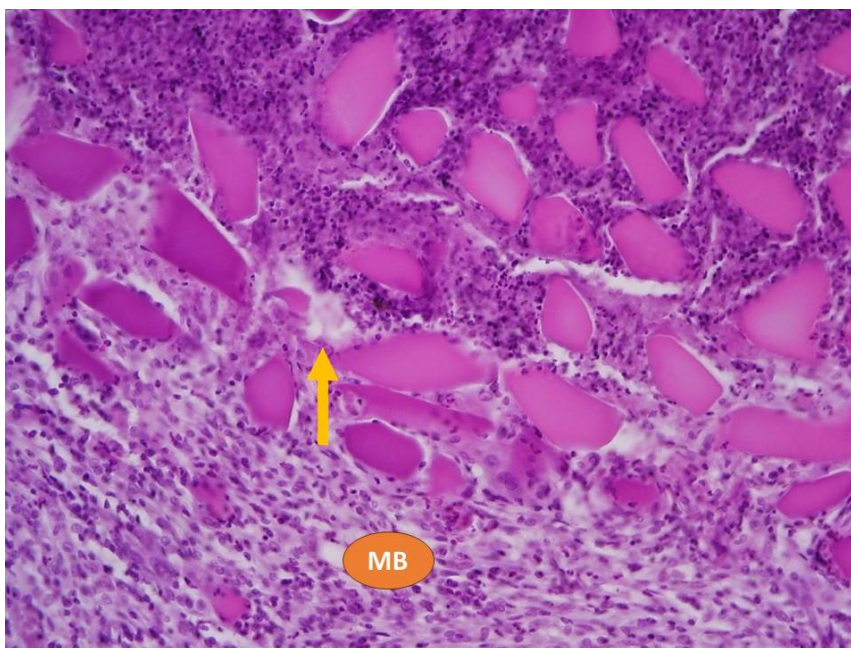


Рисунок 5.19 – Атрофія м'язових волокон та запальна інфільтрація у м'язовій тканині на 30 добу спостереження. Примітка: мв – м'язові волокна; ← запальні інфільтрати. Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 10.

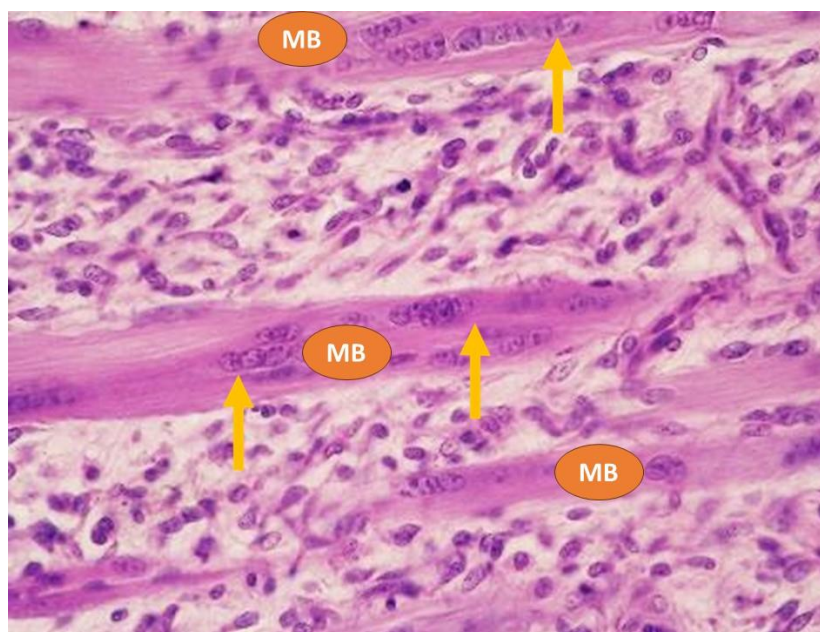


Рисунок 5.20 – Окремі м'язові волокна з ознаками регенерації у ділянці атрофії м'язу на 5 добу після моделювання травматичної ішемії та введення аспірату жирової тканини. Примітка: ← міоядра; мв – м'язове волокно. Гематоксилін з еозином. Об. 40, ок. 10.

Слід відзначити, що поява чисельних міоцелів у пошкоджених м'язових волокнах зареєстровано на 5 та 15 добу, тоді як у інших групах ці прояви регенеративного процесу у більшій мірі виявлено на 15 добу. Можна припустити, що введення аспірату жирової тканини могло активувати і пришвидшити реактивно-відновні процеси у м'язовій тканині. Також це супроводжувалось активним ангиогенезом. На ультраструктурному рівні (рис. 5.21 і 5.22) виявляли групи клітин з «бластоподібним» фенотипом, які супроводжували новоутворені мікросудини. Проте негативним наслідком після введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини стало значне утворення щільної сполучної тканини і поява запального інфільтрату. Тому на 30 добу спостереження реєстрували рубцеві зміни і атрофію м'язової тканини. Зроблено висновок, що новоутворення сполучної тканини стало реакцією на механічне пошкодження та заміщення ішемічно ушкодженої та атрофованої м'язової тканини. А реакцією на введення аспірату жирової тканини стала інфільтрація макрофагів, які активно фагоцитували продуктами розпаду некротизованих клітин, що вказує на те, що через 30 діб після ішемії та введення аспірату ще не завершилась елімінація описаних дериватів.

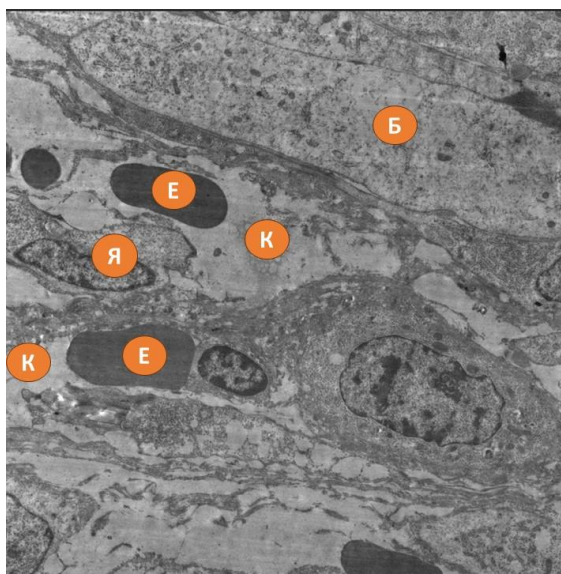


Рисунок 5.21 – Структурні перебудови м'язової тканини у ділянці некрозу на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення аспірату жирової тканини. Примітка: я – ядро ендотеліоцита; е – еритроцит; к – просвіт капіляра; б – клітина з «бластоподібним» фенотипом. Електроннограма. Зб. 10000.

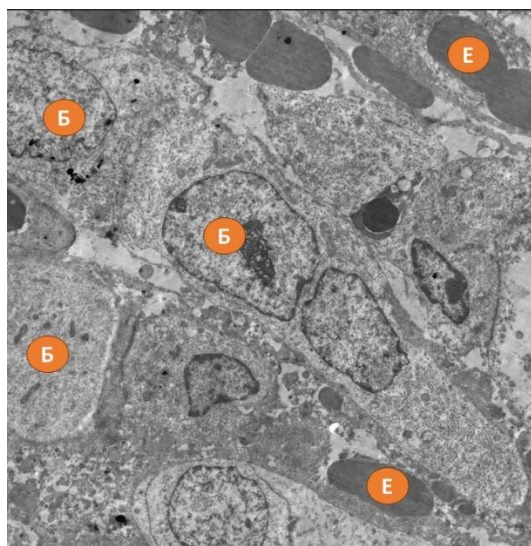


Рисунок 5.22 – Скупчення клітин з «бластоподібним» фенотипом у ділянці некрозу м'язової тканини на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення аспірату жирової тканини. Примітка: е – еритроцит; б – клітина з «бластоподібним» фенотипом. Електроннограма. Зб. 10000.

На 30 добу після введення в ділянку м'яза стромально-васкулярної фракції жирової тканини також виявлено гіпотрофію м'язових волокон (рис. 5.23). Морфологічно це проявлялось зменшенням товщини м'язових волокон, а на ультраструктурному рівні – деструкцією скоротливих міофіламентів (рис. 5.24). У пошкоджених міофібрилах неможливо розрізнити межі саркомерів, відбувається повне руйнування білкових фібрил.

Між групами м'язових волокон розташовувалися ділянки мононуклеарних клітин та фібробластів. Тільки у поодиноких м'язових волокнах виявлено додаткові групи міоядер, що вказує на те, що потенціал до активації та підтримки ендогенних регенеративних процесів на 30 добу вже зменшився. Клітинний детрит та продукти гемолізу майже остаточно еліміновані з пошкодженої м'язової тканини. Крім того, встановлено появу дрібних осередків адипоцитів, що може бути як одним з варіантів заміщення м'язової тканини на жирову, так і формуванням диференційованої жирової тканини із введеної стромально-васкулярної фракції. Таким чином, застосування стромально-васкулярної фракції жирової тканини не позначилось на суттєвій підтримці ішемічно ураженої м'язової тканини, хоча і активувало реактивно-відновні процеси на рівні окремих м'язових волокон.

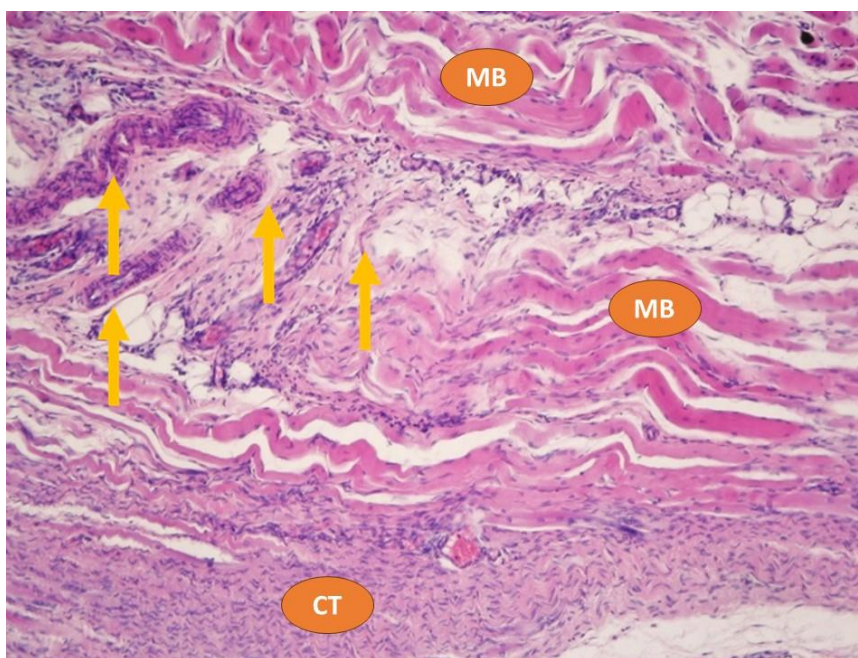


Рисунок 5.23 – Гіпотрофія м'язових волокон у скелетних м'язах гомілки кролів на 30 добу після моделювання травматичної ішемії та введення аспірату жирової тканини. Примітка: мв – м'язові волокна; ← – кровоносні судини; ст – сполучна тканина. Гематоксилін з еозином. Об. 10, ок. 10.

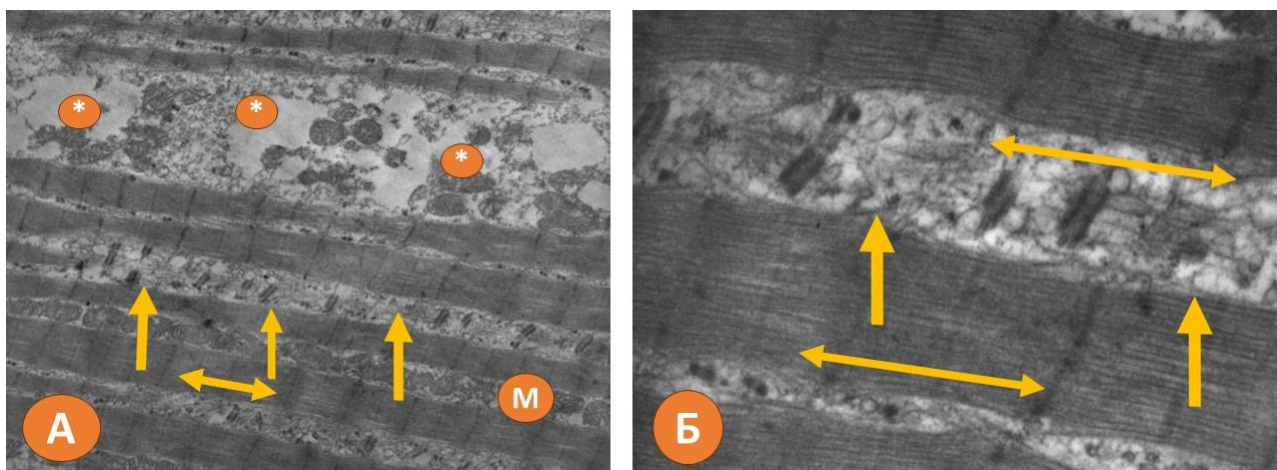


Рисунок 5.24 – Ультраструктурні зміни у м'язових волокнах на 15 добу після моделювання травматичної ішемії та введення аспірату жирової тканини. Деструкція груп міофіламентів і набряк цитоплазми. Примітка: * – деструктивні зміни; м – мітохондрії; ↔ саркомери у міофібрилах; ← деструкція міофібрил. Електроннограма. Зб. а) 20000, б) 60000.

5.4. Результати морфометричної оцінки скелетних м'язів гомілки на тлі ішемічного пошкодження кінцівки та застосування клітинної терапії

Морфометрична оцінка ішемічно пошкодженої м'язової тканини є непростим завданням. Враховуючи те, що домінуючими структурними змінами у м'язах були розвиток волокнистої сполучної тканини, заміщення останньою некротизованих м'язових волокон та гіпотрофія глибоких м'язів, то було підраховано два показники – відносну кількість сполучної тканини (позитивно забарвленого колагену у мікропрепаратах зразків м'язів) та діаметр м'язових волокон.

У таблиці 5.1 наведені відсоток структурно зміненої тканини (сумарно відображає некроз, атрофію і фіброзні зміни) у гістологічно досліджених зразках м'язів на різні терміни після моделювання травматичної ішемії. Як можна бачити з числових вимірювань, у інтактній м'язовій тканині відносна щільність колагену становить не більше $4,74 \pm 0,51\%$.

Таблиця 5.1 – Зміни ішемічно ушкоджених м'язів під впливом клітинної терапії (% колагену)

№	Група	Термін дослідження		
		5 доба	15 доба	30 доба
1	Контроль	$4,74 \pm 0,51$		
2	Ішемія	$53,87 \pm 1,61^*$	$52,68 \pm 1,47^*$	$69,89 \pm 0,85^{*^@}$
3	Ішемія + концентрат тромбоцитарної плазми	$45,60 \pm 6,43^*$	$45,06 \pm 2,47^*$	$38,39 \pm 2,99^{*^@}$ **
4	Ішемія + концентрат клітин кісткового мозку	$50,28 \pm 2,90^*$	$52,56 \pm 5,32^*$	$39,00 \pm 1,03^{*,**}$
5	Ішемія + аспірат жирової тканини	$56,33 \pm 1,71^*$	$64,84 \pm 2,60^*$	$66,13 \pm 4,28^{*^@}$

Примітка: * - $P \leq 0,05$ до контролю; ** - $P \leq 0,05$ до ішемії; @ - $P \leq 0,05$ до 5 доби; ^ - $P \leq 0,05$ до 15 доби

Колаген сполучної тканини формує тонкі стромальні прошарки (елементи) між групами м'язових волокон (чітко відмічено на рівні пери- та епімізію) (рис. 5.25).

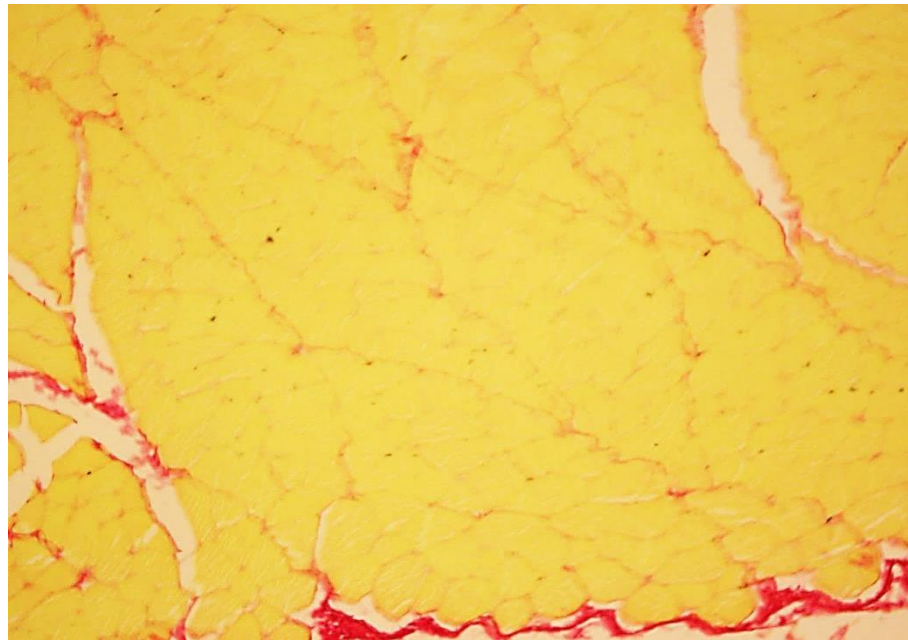


Рисунок 5.25 – Інтактна м'язова тканина в групі м'язів гомілки контрольної групи. Колаген реєструється тонкими прошарками у перимізію м'язів і у епімізію м'яза. Примітка: червоний – колаген; жовтий – м'язове волокно. Забарвлення пікросіріус червоний. Об. 20, ок. 10.

У зразках м'язів гомілки, які були пошкоджені після моделювання травматичної ішемії, виявлено структурно змінені ділянки м'язів, які характеризувалися атрофією м'язових волокон і розвитком фіброзу (у мікропрепаратах гістохімічно підтверджено як позитивно забарвлені щодо колагену регіони). На рис. 5.26-5.27 показано ділянки з фіброзом м'язової тканини. Розвиток колагеногенезу у пошкоджених м'язах починався з периферії групи м'язів, з фасції та епімізію і далі прогресував у субфасціальні міони. У таких ділянках щільність м'язових волокон зменшувалась, а їх діаметр був суттєво меншим. У динаміці експерименту не виявлено яких-небудь специфічних морфологічних особливостей колагеногенезу. Сполучна тканина заміщувала

м'язову тканину, яка була некротизованою, а у міонах з гіпотрофією м'язових волокон щільність колагену збільшувалась на рівні перимізію і у меншій мірі - ендомізію. Було проведено морфометричний аналіз відносної щільності позитивно забарвлених щодо колагену субфасціальних ділянок м'язів гомілки і одержано наступні результати. На 5 добу відновна кількість оцінюваних регіонів становила від 40% до майже 60%, а на 30 добу результати кількісних вимірювань не змінились щодо 5-ї доби (були у межах статистичної похибки), в той час як на 30 добу експерименту встановлено деякі відмінності між групами.

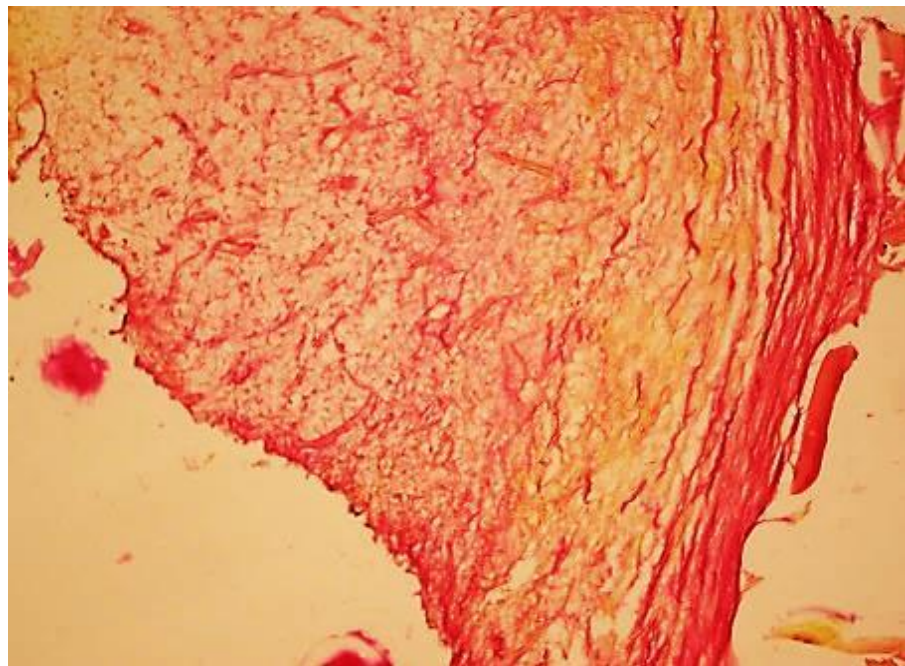


Рисунок 5.26 – Ішемічно пошкоджена м'язова тканина у скелетних м'язах гомілки на 15 добу після травматичної ішемії та введення концентрату тромбоцитарної плазми. Некроз м'язової тканини і заміщення її колагеном.
Примітка: червоний – колаген; жовтий – м'язове волокно, еритроцити у судинах.
Забарвлення пікросіріус червоний. Об. 4, ок. 10.

Так у групі з ішемією, у якій не вводили клітинні суспензії, щільність ділянок у субфасціальній зоні, які оцінено як такі, що зазнали розвитку рубцевих змін, збільшилась порівняно до 5-ї та 15-ї доби і досягала майже 70% (табл. 5.1).

Тобто незворотне пошкодження м'язової тканини після ішемії пов'язано з фіброзними змінами у м'язі, які вже на 5-ту добу досягають значного обсягу і до 15-ї доби залишаються без змін, а на 30 добу відбувається заміщення некротизованої і атрофованої тканини з прогресуючими фіброзними змінами (рис. 5.28).

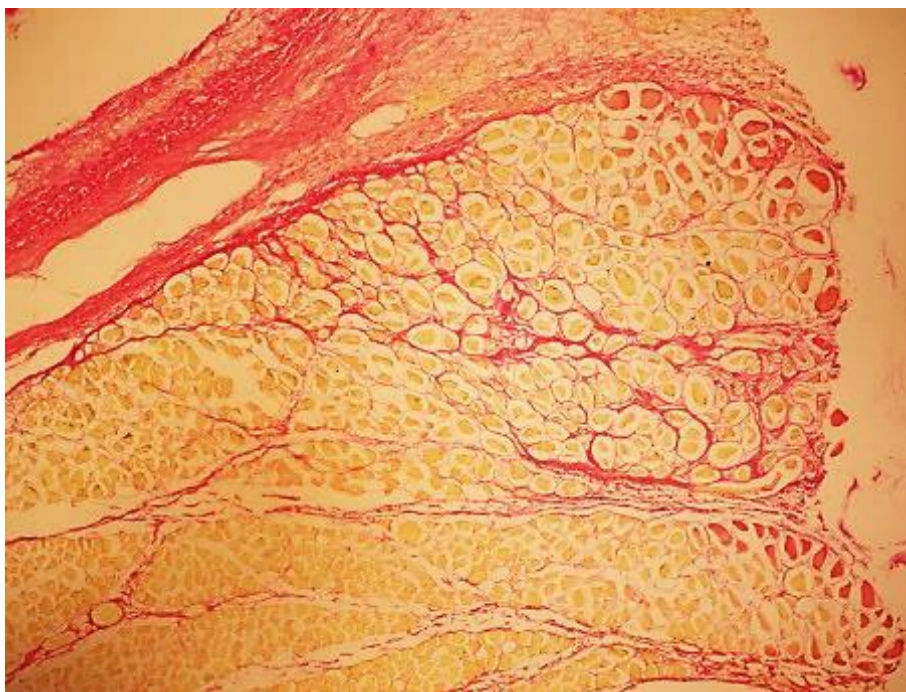


Рисунок 5.27 – Збільшення кількості сполучної тканини у скелетних м'язах гомілки на 15 добу після травматичної ішемії та введення концентрату клітин кісткового мозку. Примітка: червоний – колаген; жовтий – м'язове волокно, еритроцити у судинах. Забарвлення пікросіріус червоний. Об. 4, ок. 10.

У групі тварин з ішемією, яким вводили концентрат тромбоцитарної плазми, морфологічні особливості колагеногенезу та закономірності розвитку сполучної тканини у пошкоджених м'язах не мали суттєвих відмінностей від дослідної групи. У термін спостереження 5-ї та 15-ї доби щільність позитивних регіонів щодо колагену була у межах статистичної похибки порівняно до дослідної групи. На 30-ту добу щільність таких регіонів була дещо меншою (навіть досягла статистично значущої різниці).

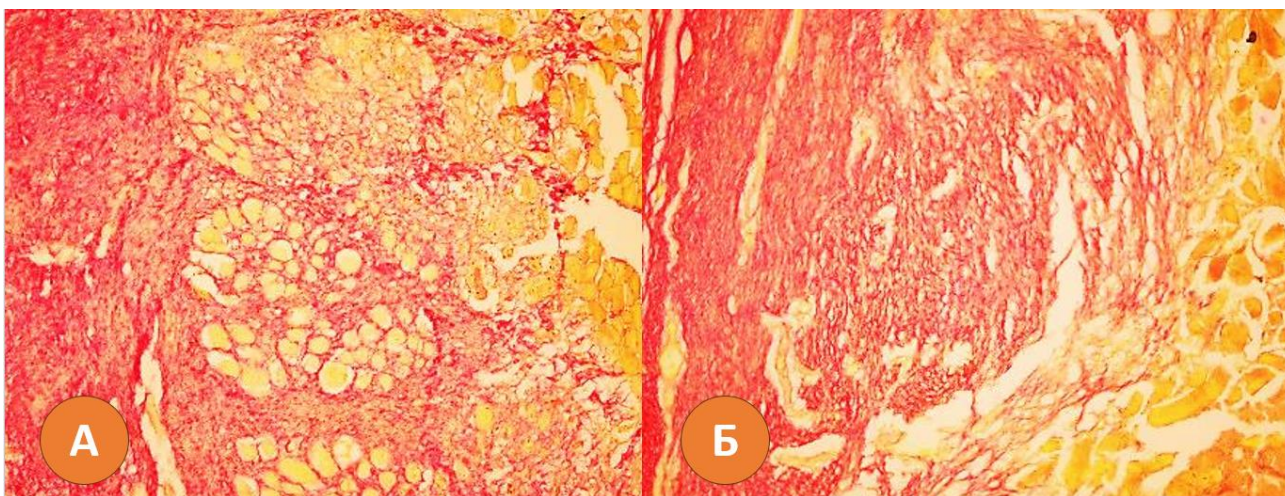


Рисунок 5.28 – Фіброзні зміни у скелетних м'язах гомілки у терміни 15 (а) і 30 (б) доби після травматичної ішемії та введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини. Примітка: червоний – колаген; жовтий – м'язове волокно, еритроцити у судинах. Забарвлення пікросіріус червоний.

а) об. 4, ок. 10; б) об. 10, ок. 10.

Можна висунути гіпотезу, що такі результати пов'язані із затримкою атрофії деяких груп м'язових волокон і тому їх заміщення сполучною тканиною відбувається дещо пізніше (тому відносна кількість таких регіонів була меншою). Разом з тим, не є виключенням той факт, що у наступні терміни спостереження у ділянках атрофії розвиток сполучної тканини мав би прогресувати, і, як наслідок, різниця вже була б нівельованою.

У групі тварин з ішемією, яким вводили концентрат клітин кісткового мозку, було одержано результати, які виявились подібними до групи з тромбоцитарною плазмою. У терміни з 5-ї до 15-ї доби динаміка розвитку сполучної тканини у субфасціальних ділянках не відрізнялась від попередніх груп порівняння, а на 30-ту добу також виявлено дещо меншу щільність таких регіонів. За таких умов також було висунуто гіпотезу про те, що введення клітин кісткового мозку затримало атрофію певної групи м'язових волокон.

У групі тварин з ішемією, яким вводили стромально-васкулярну фракцію жирової тканини, динаміка змін у термін з 5-ї до 15-ї доби не відрізнялась від інших досліджених груп, а на 30-ту добу навіть виявлено статистично значуще збільшення цих регіонів щодо 5-ї доби. Зміни були подібними до дослідної групи з ішемією, яким не вводили жодних з досліджуваних концентратів клітинних технологій. Тобто введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини не вплинуло на затримку розвитку фіброзних змін у ішемічно пошкодженій м'язовій тканині.

Для того, щоб оцінити гіпотрофію м'язових волокон, було проведено морфометрію окремих волокон, а саме зміни їх середнього діаметру. Результати морфометрії наведено у таблиці 5.2. У дослідженні оцінювали волокна у поверхневих (субфасціальних) і глибоких міонах. У субфасціальних міонах оцінювали діаметр лише тих, що не перебували у стані некрозу і розпаду. Такі зміни супроводжуються фагоцитарною реакцією макрофагів, тому їх контур нечіткий, що ускладнює їх оцінку (кількісні вимірювання таких м'язових волокон не можна вважати об'єктивними або коректними). На 15-ту і 30-ту добу такі волокна повністю розпадались і елімінувались макрофагами. Тобто морфометричне дослідження проведено на м'язових волокнах, які перебували у стані гіпотрофії, їх діаметр зменшувався, відбувалось зменшення кількості міоядер у волокнах (таблиця 5.2). За одержаними даними, м'язові волокна у глибоких міонах після ішемії кінцівки мали значно менший діаметр порівняно з волокнами у інтактній групі тварин. Їх діаметр на 5-ту та 15-ту добу не відрізнявся у межах дослідної групи, а на 30-ту добу статистично зменшився (наприклад, товщина $41,9 \pm 2,5$ мкм проти $81,5 \pm 1,4$ мкм у контролі, $P < 0,05$). Ці результати вказують на те, що загальна динаміка гіпотрофії у пошкоджених м'язах прогресує, що співпадає з одержаними результатами щодо розвитку сполучної тканини і колагеногенезу.

Таблиця 5.2 – Результати морфометрії м'язових волокон (діаметр, мкм)

№	Група	Термін експерименту, доба		
		5 доба	15 доба	30 доба
1	Контроль	81,5±1,4		
2	Ішемія	58,6±2,0*	61,4±2,1*	41,9±2,5*#^
3	Ішемія + концентрат тромбоцитарної плазми	65,9±1,7* [@]	62,7±2,3*	70,5±1,8* ^{^@}
4	Ішемія + концентрат клітин кісткового мозку	83,4±2,6* [@]	64,4±4,7* [#]	65,2±2,2* ^{#@}
5	Ішемія + аспірат жирової тканини	60,3±3,3*	52,0±1,7* [@]	45,7±1,7* [^]

Примітка: * - достовірно до контролю ($p < 0,05$); # - достовірно до 5 доби (у одній групі) ($p < 0,05$); ^ - достовірно до 15 доби (у одній групі) ($p < 0,05$); @ - достовірно до групи-ішемія (у межах одного терміну) ($p < 0,05$)

У групі тварин з ішемією, яким вводили концентрат тромбоцитарної плазми, діаметр м'язових волокон на 5-ту добу експерименту був достовірно більшим порівняно з контрольною групою, однак не досягав контрольних показників (65,9±1, мкм проти 81,5±1,4 мкм, $P < 0,05$). На 15-ту добу морфометричні дані були подібними до групи порівняння, а на 30-ту добу у збережених м'язових волокнах встановлено збільшення їх діаметру порівняно до 15-ї доби спостереження. Одержані результати пояснюються тим, що у загальній популяції м'язових волокон відбувалась гіпертрофія окремих волокон, що вплинуло на статистичні дослідження.

У групі тварин з ішемією, яким вводили концентрат клітин червоного кісткового мозку, виявлено кращий ступінь збереження м'язових волокон у

глибоких міонах і швидшу елімінацію продуктів некрозу у субфасціальних міонах. За даними морфометрії, на 5-ту добу діаметр м'язових волокон не відрізнявся від контрольних значень і був більшим від значень у групі з ішемією ($p < 0,05$). Така різниця пояснюється тим, що частина пошкоджених волокон мала більший діаметр через набряк. На 15-ту добу діаметр м'язових волокон був таким, як у групі з ішемією. На 30-ту добу кількісні значення не змінилися, що оцінено як прояв затримки гіпотрофії м'язових волокон. На морфологічному рівні виявлено кращу збереженість м'язових волокон, наявність поперечної посмугованості і помірне збільшення кількості міоядер.

У групі тварин з ішемією, яким вводили клітини жирової тканини (стромально-васкулярну фракцію), результати морфометричної оцінки кількісно підтвердили прогресуючу гіпотрофію м'язових волокон. Достовірно менший діаметр щодо групи з ішемією встановлено на 15-ту добу після введення аспірату жирової тканини (в середньому на 15,3%, $p < 0,05$), а на 30-ту добу різниці кількісних значень не виявлено. Ці дані вказують на те, що після введення аспірату жирової тканини у ішемізований м'яз гіпотрофія розвивалася більш стрімко, тобто мав місце негативний наслідок.

Було проведено кореляційний аналіз між показниками, які характеризують розвиток сполучної тканини і показниками ультразвукових досліджень. Кореляційний аналіз показав високий зв'язок між вертикальною δ -ентропією і ступенем пошкодження м'язів на тлі механічної ішемії кінцівки (табл. 5.3). Кореляцію з горизонтальною δ -ентропією виявлено тільки у групі з концентратом клітин кісткового мозку, і ці результати мали протилежний напрямок між термінами. Ми прийшли до висновку, що значущим показником у дослідженні пошкодження м'язів при сонографії є вертикальна δ -ентропія. Зроблено висновок, що за рівнем вертикальної δ -ентропії можна оцінювати і прогнозувати тяжкість компартмент-синдрому і структурні зміни м'язів у реактивно-відновлювальному періоді.

Таблиця 5.3 – Ступінь кореляції між відсотком некрозів ішемізованих м'язів і δ -ентропією

№	Група	Термін дослідження					
		5 доба		15 доба		30 доба	
		δ -ентропія					
		вертикаль на δ - ентропія	горизонт альна δ - ентропія	вертика льна δ - ентропія	горизон тальна δ - ентропія	вертикал ьна δ - ентропія	горизонт альна δ - ентропія
2	Ішемія	r=0,90; p=0,04	r=0,70; p=0,19	r=1,00; p<0,001	r=-0,80; p=0,10	r=1,00; p<0,001	r=0,20; p=0,75
3	Ішемія + концентрат тромбоцитарн ої плазма	r=1,00; p<0,001	r=-0,10; p=0,87	r=1,00; p<0,001	r=-0,50; p=0,39	r=0,30; p=0,54	r=0,10; p=0,87
4	Ішемія + концентрат клітин кісткового мозку	r=1,00; p<0,001	r=-0,90; p=0,04	r=1,00; p<0,001	r=0,10; p=0,87	r=0,90; p=0,04	r=0,60; p=0,28
5	Ішемія + аспірат жирової тканини	r=0,87; p=0,05	r=-0,30; p=0,62	r=0,90; p=0,04	r=-0,60; p=0,28	r=1,00; p<0,001	r=0,10; p=0,87

Висновок до розділу. Таким чином, на основі проведених гістологічних досліджень зроблено кілька важливих висновків. По-перше, гіпотрофія скелетних м'язів при 6-годинній турнікетній ішемії розвивається стрімко і безповоротно. Ступінь пошкодження (в першу чергу некроз м'язових волокон та розвиток фіброзних змін) та гіпотрофії є неоднорідним і більшим у субфасціальних міонах, тоді як глибокі міони характеризуються меншим рівнем

пошкодження м'язових волокон і відтермінованою атрофією, що знайшло відображення в їх морфометричних показниках. По-друге, застосування тканинних технологій лише частково запобігає гіпотрофії м'язу у віддаленому терміні. Ішемічне пошкодження і наступний некроз поверхневих м'язів у субфасціальній ділянці є незворотнім. Ці ділянки зазнають значного розвитку сполучної тканини і формування колагенових фібрил, заміщення сполучною тканиною м'язових волокон. Введення концентрату тромбоцитарної плазми, клітин кісткового мозку і стромально-васкулярної фракції жирової тканини не призводить до відновлення м'язової тканини в субфасціальних ділянках. Реактивно-відновні зміни у глибоких м'язах пошкоджених м'язів є неоднорідними між групами порівняння. Після введення концентратів тромбоцитів та клітин кісткового мозку структурні зміни можна охарактеризувати як такі, що мають позитивну тенденцію до затримки розвитку фіброзу м'язової тканини і атрофії м'язових волокон. Разом з тим, ефект введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини не вплинув на динаміку гіпотрофії м'язових волокон, а щодо розвитку сполучної тканини - навіть міг сприяти її розвитку. По-третє, результати морфометричних досліджень м'язової тканини корелюють з результатами ультразвукових досліджень, а за результатами вертикальної δ -ентропії можна прогнозувати динаміку фіброзних змін у ішемічно пошкоджених тканинах кінцівки. Дискусійним залишається питання щодо частоти застосування досліджених підходів клітинних технологій, можливо кількаразове введення сприяло б покращенню результатів, але це потребує подальшого дослідження.

РОЗДІЛ 6

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ У ІШЕМІЗОВАНИХ НЕРВАХ ТА М'ЯЗАХ ПРИ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНІЙ ІШЕМІЇ КІНЦІВКИ ТА ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ НА ВІДНОВНІ ПРОЦЕСИ

Скелетні м'язи мають низьку толерантність до ішемії всього 6 годин, а термін реперфузії ішемізованої кінцівки має вирішальне значення для виживання тканин (M. Siemionow [181]). При ішемії кінцівки зростає проникність мікросудин (M. Drysch [62]) і через 2 години після ішемії виникає набряк тканин (C. Duehrkop [63]), життєздатність м'язів зменшується на 20%, а через 8 годин - на 80% (M.S. Cunha [57]). Вторинне пошкодження м'язів відбувається у результаті накопичення цитотоксичних молекул, головним чином супероксидного радикалу, пероксинітриту і окиснених жирних кислот (F.N. Ekinici Akdemir [64], M. Bianco-Batlles [41]). Ці показники можуть бути використані для оцінки пошкодження м'язової тканини у гострому періоді пошкодження. У власному експериментальному дослідженні поставлено завдання дослідити вплив клітинних технологій на зміни патобіохімічних процесів у скелетних м'язах кінцівки після 6-годинної ішемії.

Результати біохімічних досліджень показали істотне зростання у м'язовій тканині активності антиоксидантних ензимів супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КАТ) на 15 добу експерименту (рис. 6.1) і навпаки, різким падінням рівня активності глутатіонпероксидази (ГП) у всі терміни експерименту (рис. 6.2). Підвищена активність СОД і КАТ оцінено як наслідок реперфузійного ушкодження. Це знайшло своє відображення у гіперпродукції нітриту-аніону (NO^{2-}). На 30 добу активність СОД і КАТ вірогідно зменшилась до контрольних значень, тоді як рівень NO^{2-} залишився без істотних змін, що є доказом його стабільного синтезу (рис. 6.3). Різке падіння активності глутатіонпероксидази

можна пояснити «виснаженням» ферментативної ланки, яка спрямована на утилізацію продуктів пероксидації. Внаслідок цього на тлі реперфузії вміст продуктів пероксидації ліпідів (ТБК-активних продуктів і дієнових кон'югатів) та білків (дифенілгідрозон) був несуттєво зменшеним або залишався на рівні статистичної похибки (рис. 6.4).

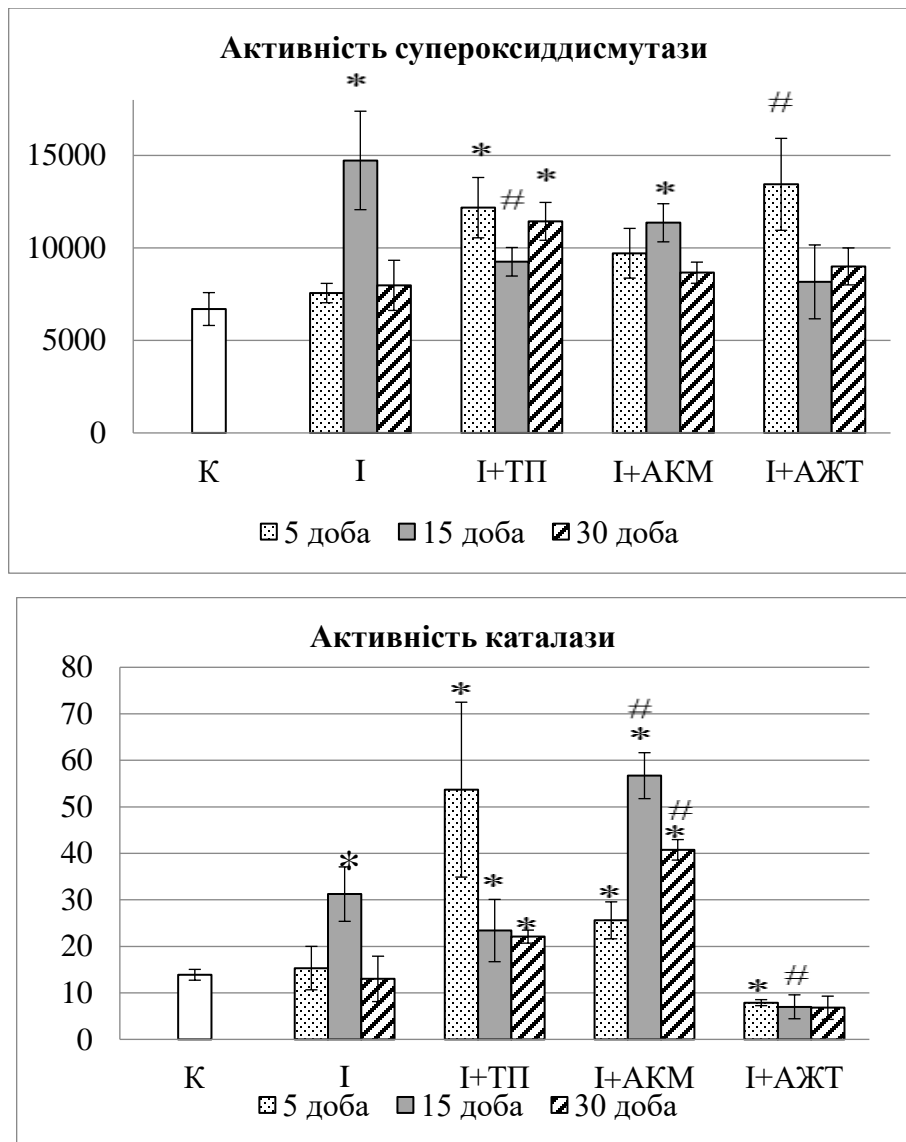


Рисунок 6.1 – Активність супероксиддисмутази (СОД, нмоль/хв на мг протеїну) і каталази (КАТ, мкмоль/хв на мг протеїну) у м'язах гомілки після ішемії.

Примітка: К – контроль; І – ішемія; ТП – тромбоцитарна плазма; АКМ – аспірат кісткового мозку; АЖТ – аспірат жирової тканини; * достовірно до контролю ($P < 0,05$); # достовірно до ішемії (один термін) ($P < 0,05$).

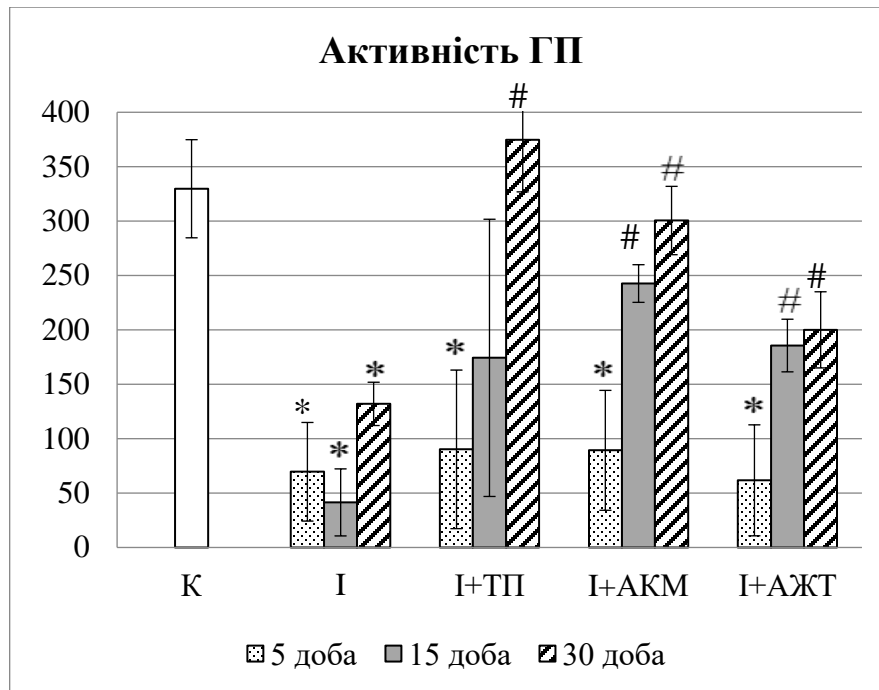


Рисунок 6.2 – Активність ГП (нмоль/хв на мг протеїну) у м'язах гомілки після ішемії. Примітка: К – контроль; І – ішемія; ТП – тромбоцитарна плазма; АКМ – аспірат кісткового мозку; АЖТ – аспірат жирової тканини; * достовірно до контролю ($P < 0,05$); # достовірно до ішемії (один термін) ($P < 0,05$).

На основі результатів досліджень зроблено висновок про різкі зміни системи антиоксидантного захисту у м'язах після 6-годинної ішемії. Після реперфузії відбулось падіння активності глутатіонпероксидази у гострому періоді пошкодження і далі - додаткова активація СОД і КАТ. Така реакція антиоксидантної системи спрямована на утилізацію продуктів пероксидації, які накопичуються при ішемії і реперфузії. При цьому гіперпродукцію нітрит-аніону реєстрували у всі терміни, тоді як гіперпродукція продуктів окисненої модифікації ліпідів і білків (ТБК-активні продукти, ДНФГ) була частково або вірогідно зменшена.

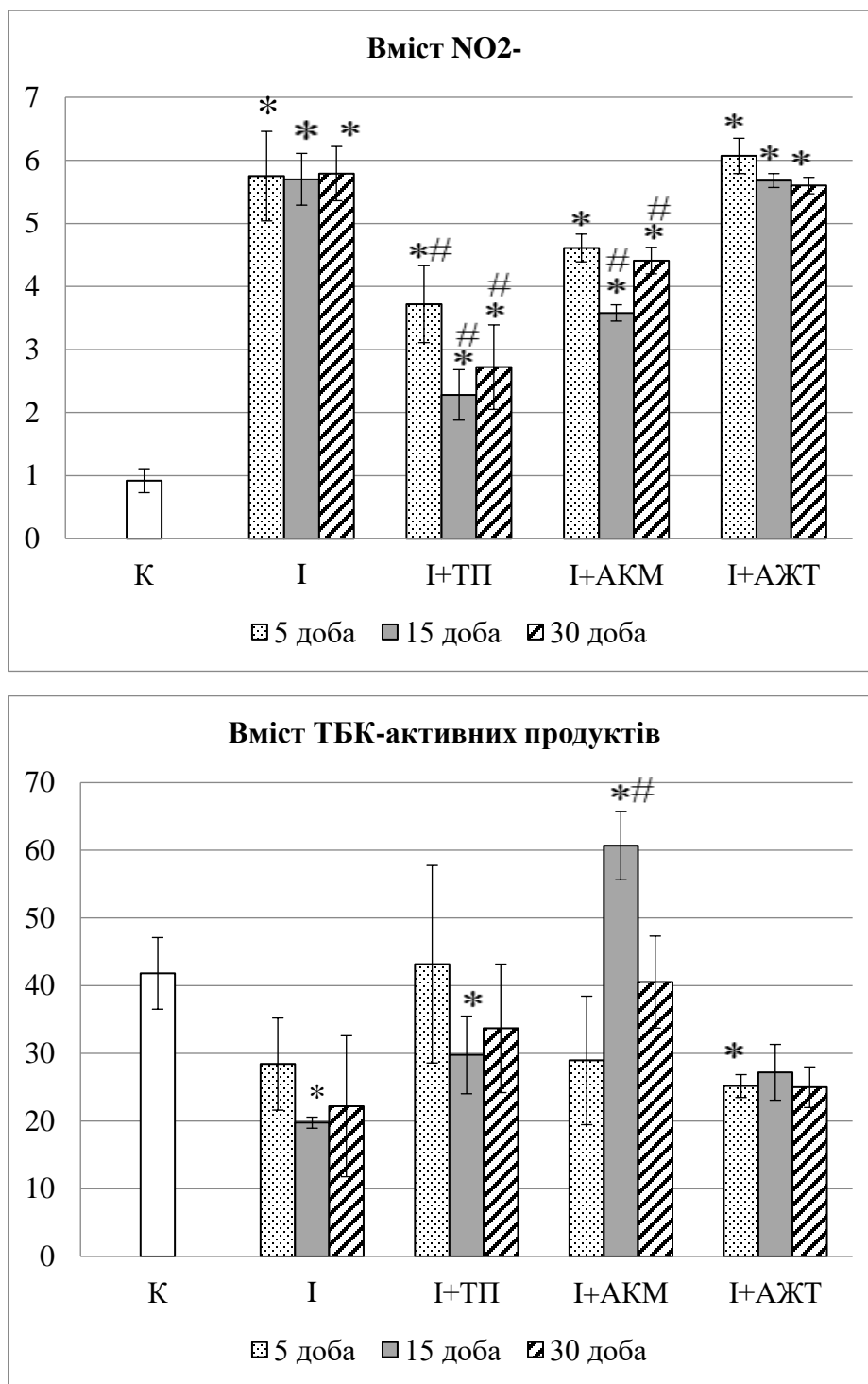


Рисунок 6.3 – Вміст NO₂⁻ (мкг/г тканини) і ТБК-активних продуктів (нмоль МДА/г тканини) у м'язах гомілки після ішемії. Примітка: К – контроль; І – ішемія; ТП – тромбоцитарна плазма; АКМ – аспірат кісткового мозку; АЖТ – аспірат жирової тканини; * достовірно до контролю (P < 0,05); # достовірно до ішемії (один термін) (P < 0,05)

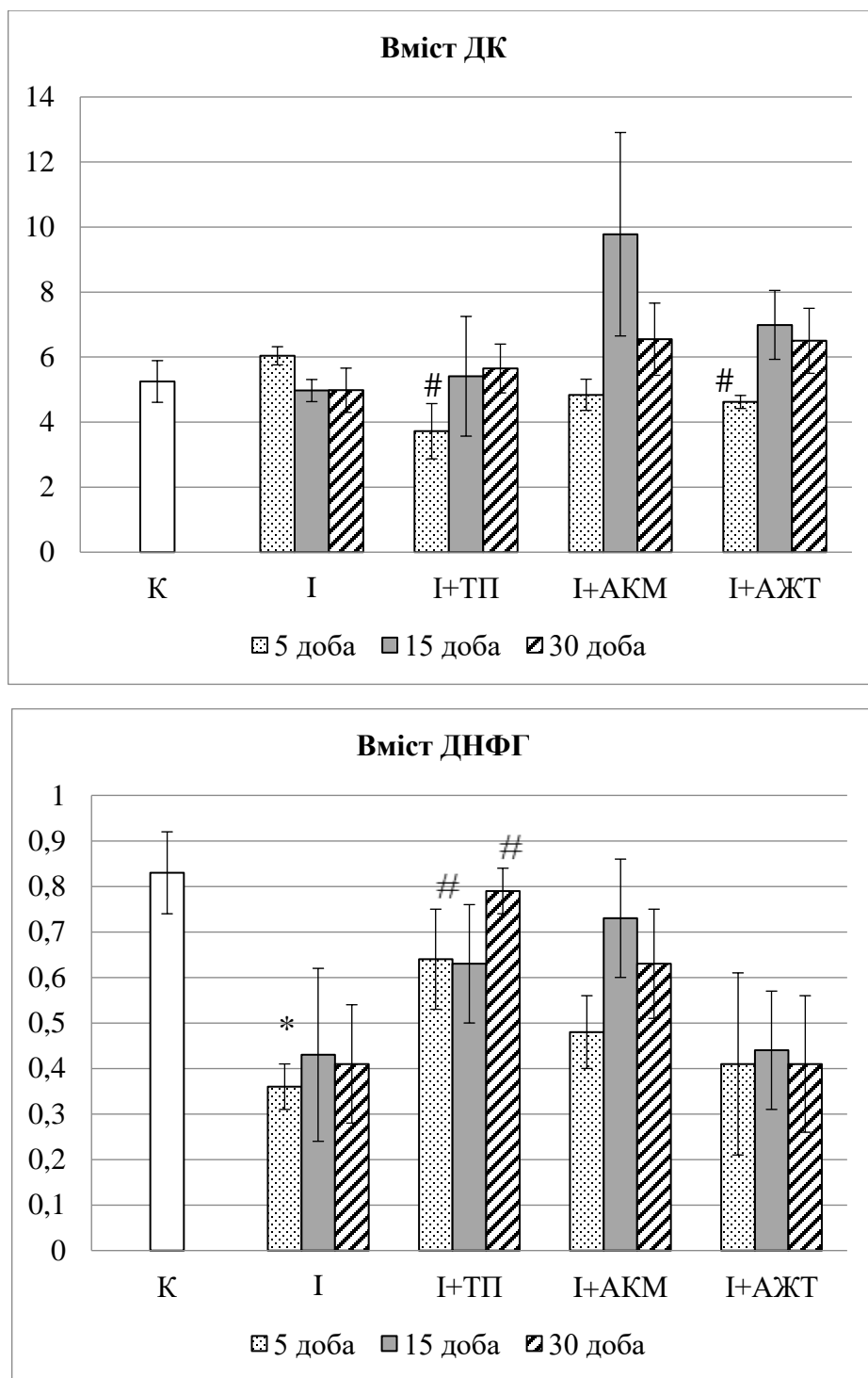


Рисунок 6.4 – Вміст дієнових кон'югатів (ДК, нмоль ДК/г тканини) і дифенілгідрозона (ДНФГ, нмоль/мг протеїну) у м'язах гомілки після ішемії. Примітка: К – контроль; І – ішемія; ТП – тромбоцитарна плазма; АКМ – аспірат кісткового мозку; АЖТ – аспірат жирової тканини; * достовірно до контролю ($P < 0,05$); # достовірно до ішемії (один термін) ($P < 0,05$)

Аналіз біохімічних результатів після введення клітинних технологій показав відмінності метаболічних ефектів різних клітинних суспензій. Після введення збагаченої тромбоцитарної плазми (ТП) встановлено активацію СОД і КАТ у гострому періоді і глутатіонпероксидази додатково на 30-ту добу після пошкодження (рис. 6.1, 6.2). Застосування аспірату кісткового мозку (АКМ) сприяло вірогідному зростанню активності КАТ і глутатіонпероксидази на 15-ту і 30-ту добу. А відповідь м'язової тканини на введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини полягала у вираженій відповіді СОД на 5-ту добу. Тобто після ішемічного пошкодження відбувалась активація ферментів антиоксидантної системи на 15-ту добу, а дія тромбоцитарної плазми прискорила активацію цієї ферментативної системи. Дія клітин кісткового мозку характеризувалась більш пролонгованою відповіддю антиоксидантної системи, а реакцію СОД на 5-ту добу після введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини можна оцінювати як реакцію на її введення у м'язову тканину. Разом з тим, на 15-ту і 30-ту добу встановлено достовірне збільшення активності ГП у всіх трьох групах порівняння, що вказує на активацію і часткове відновлення роботи антиоксидантної ланки захисту на тлі ішемічного ушкодження.

Встановлено достовірне зменшення нітрит-аніону у всі три терміни експерименту після введення тромбоцитарної плазми і на 15-ту і 30-ту добу після введення концентрату клітин кісткового мозку, що можна оцінити як прояв його утилізації антиоксидантними ферментами. Додатково підвищеним був рівень ДНФГ, що також вказує на відновні процеси, оскільки метаболічні процеси у клітинах постійно супроводжуються окисненням білкових молекул.

На 15 добу експерименту додатково виявлено збільшення ТБК-активних продуктів у групі з клітинами кісткового мозку, що оцінено як відтерміновану реакцію м'язової тканини на введення цих клітин, на появу продуктів розпаду. Цим пояснюється одночасне збільшення рівня ДК, які є продуктами перекисного окиснення ліпідів.

На 30 добу експерименту метаболічна відповідь м'язів на введення аспірату кісткового мозку вже завершилась, хоча активність каталази і рівень нітрит-аніону залишались високими. Після введення тромбоцитарної плазми додатково до зазначених показників залишалась підвищеною активність СОД. На відміну від цього, дія стромально-васкулярної фракції жирової тканини характеризувалась постійно високим вмістом у м'язовій тканині нітрит-аніону і профіль біохімічних процесів у більшій мірі був подібним до групи з ішемією. Падіння активності каталази і гіперпродукція нітрит-аніону є біохімічним проявом некрозу.

Висновок до розділу. Патогенез ішемічно-реперфузійного ушкодження м'язової тканини розпочинається у період ішемії і продовжується після відновлення кровотоку, в період реперфузії. Гостра ішемія спричиняє дефіцит кисню і гальмування транспорту електронів в дихальному ланцюзі мітохондрій, зменшення утворення макроергічних сполук (АТФ, КФ) і гіперпродукцію активних форм кисню, вільних радикалів (АФК) (R. Soares [184]). Важливу роль у детоксикації надлишку АФК виконують ензими антиоксидантного захисту (АОЗ) – каталаза, СОД, глутатіонпероксидаза. Зміни їх рівня активності можуть бути показником відновлення після ішемічного пошкодження. Предметом даного дослідження було вивчення активності основних ензимів та вмісту продуктів пероксидної модифікації ліпідів та протеїнів у м'язовій тканині гомілки кроля на більш віддалених часових періодах, а саме на 5, 15 та 30 добу після ішемічно-реперфузійного ураження, а також оцінка можливого терапевтичного ефекту застосування аутологічного аспірату кісткового мозку.

Результати досліджень доводять вірогідне зростання активності ферментів антиоксидантного захисту в ішемічно ушкоджених м'язах гомілки кроля на 15 добу експерименту. При цьому активність ГП, навпаки, істотно знижувалась. Відомо, що ГП активується за присутності низьких кількостей пероксиду та ліпопероксидів, тоді як за високих концентрацій пероксиду водню активується

КАТ (R. Soares [184]). Можна стверджувати про надмірне продукування активних форм кисню (АФК) у віддалені терміни після ішемії-реперфузії м'язів гомілки. Проте, результати аналізу рівня продуктів пероксидної модифікації ліпідів та протеїнів (ТБК-активних сполук, ДК та похідних дифенілгідрозонію) свідчать про те, що така кількість АФК «нейтралізується» антиоксидантними ферментами. В той же час привертає увагу незмінно високий вміст нітрит-аніону (у 5 разів вище за норму) протягом всього періоду експерименту. Добре відомо, що NO відіграє важливу роль, як ендотелійний фактору релаксації, у регуляції гемодинаміки, проте, при надмірній продукції його за умов реоксигенації він є джерелом токсичного продукту пероксинітриту (ONOO^-), тим самим, зменшуючи біодоступність самого NO та посилюючи ушкоджуючу дію на макромолекули. В той же час, пероксинітрит метаболізується (окиснюється) до нітриту (NO_3^-), який нітритредуктазами може бути відновлений до NO, Отже, вміст нітрит-аніону (NO_2^-) є інтегральним показником, що вказує на характер та напрямок змін продукування оксиду азоту в ішемічно ушкоджених тканинах. Вміст нітрит-аніону в м'язовій тканині гомілки кроля залишався високим впродовж всього терміну експерименту і не змінювався. Цей факт може свідчити про наявність запального процесу і про залучення індукованої ізоформи NO – синтази (iNOS) у формування пулу нітриту в м'язовій тканині після ішемічно-реперфузійної травми. Запальний процес, що розвивається внаслідок масової загибелі клітин шляхом некроптозу, про що свідчать результати гістологічних досліджень (див. Розділи 3 і 5), протікає із залученням лейкоцитів та макрофагів у вогнище запалення, при цьому NO, що продукується цими клітинами, може сприяти зростанню пулу нітриту у м'язовій тканині.

Застосування досліджуваних клітинних технологій в умовах даного експерименту спричиняло модулювання активності ферментів антиоксидантного захисту м'язової тканини гомілки кроля. Активність СОД наближалась до значень у контролі, натомість активність КАТ і особливо ГП істотно зростала і залишалась

досить високою до закінчення експерименту. Найбільш виразний ефект застосування клітинних технологій полягав у зменшенні вмісту нітрит-аніону, що може опосередковано свідчити про менший ступінь пошкодження м'язової тканини і менший рівень неробіотичних змін, тоді як введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини не дало такого результату. З огляду на багатоконпонентність застосованих клітинних аспіратів та суспензій, досить важко дати остаточну відповідь щодо конкретних біохімічних механізмів та лікувально-профілактичної дії. Можна лише спекулятивно допускати роль цитокінової системи тромбоцитів та кісткового мозку у складі аутологічного аспірату в зменшенні запального процесу в м'язовій тканині гомілки кроля на віддалених термінах її ішемічно-реперфузійного ушкодження.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У травматології широко застосовують аутологічні тканинні технології, зокрема при лікуванні артрозу, травм периферійних нервів і сухожилків кінцівки. Простим у одержанні, застосуванні і перспективним є концентрат тромбоцитарної плазми (PRP) (E.S. Machado [125]) і клітин, одержаних з аспіратів кісткового мозку (M. Vitali [208]) та жирової тканини, зокрема при периферійних нейропатіях (M.A. Malahias [129]). Опубліковано ряд досліджень, які наводять позитивні та перспективні результати їх застосування для терапії пошкоджень сухожилків (S.J. Kim [104; 105]), стегнового суглобу (M.T. Houdek [93]), при остеоартриті (A. El-Kadiry [65]). Очевидно, що ця технологія може бути корисною для лікування травм кінцівки (A. Mazzotta [133]), для впливу на стан ішемічно уражених м'язів кінцівки, але порівняльних результатів клінічних досліджень у відкритих джерелах ми не знайшли. Допомогти у розробці способу лікування та виявити недоліки застосування кожної з цих технологій можуть експериментальні дослідження. Разом з цим, на експериментальних моделях ішемії кінцівки або периферійних нервів одержано значну кількість даних (T.P. Tran [200]), але не всі результати можна ототожнювати з наслідками компресійної ішемії кінцівки людини і тому такі порушення потребують додаткового вивчення. Невирішені завдання цієї проблеми були взяті за основу наших наукових пошуків.

Запропонована тваринна модель є стандартизованою при застосуванні якої результати можливо відтворити, результати моделювання пошкодження кінцівки мають подібні патогенетичні ланки розвитку змін у кінцівці хворих, тоді як більшість подібних експериментальних досліджень виконуються на моделях катетеризації, емболізації або інших пошкоджень магістральних судин кінцівки і викликають розвиток критичної ішемії (Del Giudice, [59], E. Wang [210]). Через 6 годин після зняття еластичного джгута, у м'язи гомілки кінцівки було одноразово

введено концентрат тромбоцитарної плазми, аспірати клітин, які були одержані з кісткового мозку та жирової тканини. Результати власних гістологічних досліджень показали значне пошкодження м'язової тканини та сполучної тканини у динаміці досліджень. Показано, що 6-годинна механічна ішемія кінцівки достовірно викликає некроз м'язів кінцівки, який характеризується особливою топографією виникнення структурних змін і активацією деяких відновних процесів у м'язах. Результати власних досліджень автора А. Pidlisetskyu [162-164] показали, що скелетні м'язи та периферичні нерви кінцівки мають різну стійкість до компресійної ішемії. Є очевидним, що скелетні м'язи кінцівки зазнають більш значного пошкодження при компресії кінцівки, в більшому ступені поверхневі ділянки (поверхневі, субфасціальні міони), ніж периферійні нерви. У відтвореній моделі компресійного пошкодження кінцівки на скелетні м'язи та периферійні нерви впливають одночасно два патогенні чинники – компресія і ішемія тканин. На морфологічному рівні наслідки судинної ішемії не завжди можливо відрізнити від наслідків компресійної ішемії, оскільки прояви некрозу клітин є неспецифічними, особливо у терміни 5, 15 і 30 діб.

Виявлено, що після 6-годинної ішемії у скелетних м'язах гомілки відбувалася прогресуюча гіпотрофія, яка полягала у деформації тканин, некрозі м'язових волокон, зменшенні кількості м'язової тканини і розвитку сполучної тканини. Пошкодження м'язів було пов'язане не тільки з безпосередньою механічною травмою, але і відтермінованими змінами мікроциркуляції у скелетних м'язах. На це вказували гістологічні ознаки некрозу клітин у стінці кровоносних судин, фокальні крововиливи, тромбоз у судинах. Інтерстиційний набряк і геморагічне просочування пошкодженої м'язової тканини на 5 і 15 добу експерименту були наслідком некрозу клітин кровоносних судин. На 30 добу ознаки набряку мали менший ступінь вираження, порівняно до попередніх термінів дослідження. Розвиток інтерстиційного набряку залежав від стану мікросудин і ступеня збереження фасції м'язу. Вторинні мікроциркуляторні

розлади могли виникнути в результаті розвитку набряку, який збільшує внутрішньотканинний тиск всередині замкнутого фасціального простору м'язу, як показано у дослідженнях J.G. Kim [104; 105]. В результаті цих процесів ще більше посилюється набряк, регіональна ішемія і накопичення у тканинах цитотоксичних метаболітів (D.P. Singh) [182]. Збільшення кровотоку при реперфузії (K. Ikebe [94]) викликає геморагічний інфаркт, оскільки структурна цілісність та метаболічна активність клітин ішемічно пошкоджених судин порушується. У наших власних дослідженнях це підтверджено утворенням значного набряку і геморагічним просоченням поверхневих міонів м'язів гомілки. На 30 добу після пошкодження у ділянках некрозу виявлено формування клітинної сітки із значною кількістю сполучної тканини, що є морфологічною ознакою формування рубцевих змін у м'язах.

За даними наукової літератури (наприклад, B. Langridge [113]), обширні ушкодження скелетної м'язової тканини відзначаються низькою репаративною спроможністю. Результати наших досліджень не суперечать цим даним, підтверджують вже відомі уявлення і в певній мірі розширюють їх. Виявлено, що на межі з некрозами наявні м'язові волокна із збільшеною кількістю міоядер, що в певній мірі оцінюється як прояв регенеративних процесів (як стверджується у роботі L. Forcina [70]). Ці явища вже мали місце на 5 добу досліджень і до 30 доби не припинялись, але і відновлення м'язової тканини не відбувалось. Згідно робочої гіпотези, використання клітинної технології та тромбоцитарної плазми може вплинути на регенеративні процеси м'язових волокон, що потребувало поглиблених досліджень (F. Chellini) [52]. Пригнічення запального стану та зменшення розміру фіброзного рубця було продемонстровано після введення в уражені м'язи тромбоцитарної плазми (Z. Punduk) [166]. В проведених нами дослідженнях за використання концентрату тромбоцитарної плазми на всі терміни гістологічного дослідження були присутні дегенеративні зміни м'язової тканини з формуванням ділянок фіброзу, і тільки поодинокі м'язові волокна з ознаками

регенерації (збільшення кількості міоядер). Тобто результати гістологічних досліджень не показали переконливих доказів позитивного ефекту введення тромбоцитарної плазми щодо активації відновлення м'язових волокон тощо. Після введення клітин аспірату кісткового мозку та стромально-васкулярної фракції жирової тканини виявлено збільшення інтенсивності репаративного процесу у м'язових волокнах, збільшення кількості міотубул. Разом з цим введення фракції жирової тканини викликало запальну інфільтрацію, що є небажаним наслідком застосування клітин одержаних із жирової тканини шляхом аспірації. Таким чином, пошкодження м'язів, їх атрофія і деякі (слабкі) ознаки регенерації м'язових волокон виявлено у власних дослідженнях під дією концентрату аспірату кісткового мозку.

Результати сонографії не давали можливості виявити ефекти клітинних технологій у досліджувані терміни. Лише на 5 добу виявлено зниження ентропії введення концентрату аспірату кісткового мозку, а на 15 і 30 добу рівень ентропії не відрізнявся від контралатеральної кінцівки і між групами порівняння. На основі експериментальних даних зроблено висновок, що сонографічне дослідження має значення для оцінки змін ішемічно пошкоджених тканин кінцівок лише на ранніх стадіях розвитку некрозів.

Також нас зацікавив інший аспект компресії кінцівки, а саме зміни периферійних нервів кінцівки. Ми припустили, що великі нерви, такі як сідничний нерв, можуть мати ділянки некрозу через особливості анатомічного положення у кінцівці; можливо, їх глибоке анатомічне положення у міжм'язовому просторі м'язів кінцівки дозволить запобігти тяжкому компресійному пошкодженню, а також постає питання чи позначиться на стані нерва введення тромбоцитарної плазми, аспірата клітин, які були одержані з кісткового мозку та жирової тканини. Результати опублікованих клінічних спостережень Н. Nukada [150] свідчать, що втрата нервових волокон при хронічній некомпресійній ішемії є не критичною, наприклад зазнають структурних змін менше 5% мієлінових нервових волокон

(деформація і демієлінізація мієлінові оболонки). Висунуто припущення, що зменшення швидкості проведення нервових імпульсів за цих умов головним чином обумовлено в більшому ступені аксональною дегенерацією, ніж демієлінізуючим процесом (D.A. Kaku [100]). Але слід зазначити, що спонтанне відновлення також можливе. Так, H. Nukada et al. [149] виявили регенеруючі нервові волокна у ішемічно пошкоджених нервах кінцівки через 1-6 місяців. При цьому пошкодження нервів і наступна дегенерація нервових волокон можуть виникати без значного пошкодження скелетних м'язів (A.J. Wilbourn [215]). Це пояснюється більшою вразливістю нервових волокон порівняно з м'язовою тканиною до ішемії (H. Nukada [149]).

З експериментальних робіт відомо, що ішемія кінцівки різного генезу позначається на стані м'язів та периферійних нервів, хоча результати, повідомлені різними авторами, суттєво відрізняються. Так, в одних дослідженнях 2-х годинна компресійна ішемія викликала прогресуючу дегенерацію нерва (D.G. Hartiman [85]), а в інших - 12-годинна компресія викликає лише ендоневральний набряк (G. Lundborg [123]). При цьому у перші 4-6 годин після зняття турнікету провідність нерва ще залишалась (G. Lundborg [123]). Відомо про фіброзні зміни у м'язах і нервах через 6 тижнів після оклюзії стегнової артерії (D.G. Hartiman [85]). Деякі ознаки регенерації окремих м'язових волокон реєстрували через місяць (P.W. Nathaway [87]) після обмеженої мікроемболії артерій кінцівки. Описані дані у різних авторів відрізняються, що пов'язано із застосуванням різних методів у кожному з досліджень, наприклад тільки електрофізіологічних або морфологічних. Спільним висновком є те, що при некомпресійній ішемічній нейропатії дегенеративні зміни у нервах можуть протікати без значного некрозу м'язів, проте нервові стовбури більш вразливі до гіпоксії, ніж м'язи (A.J. Wilbourn [215]). Вирішенню цих дискусійних питань також було присвячено окремий розділ дисертації.

У власній роботі одержано наступні результати: 6-годинна турнікетна ішемія кінцівки не викликала безпосереднього некрозу структурних елементів сідничного нерва, як це яскраво проявляється у м'язах, а дегенерація деяких мієлінових нервових волокон на рівні великогомілкового нерва була пов'язана з локалізацією вогнища компресійної ішемії (еластичний джгут займав більшу площу поверхні гомілки). Тобто не виникає сумнівів у існуванні прямої залежності між ступенем пошкодження нерва та локалізацією компресії кінцівки. Нами висунуто припущення, що часовий проміжок перших годин після відтворення компресійної ішемії може бути використаний в якості «терапевтичного вікна» для підтримки тканин кінцівки, в тому числі периферійних нервів. Тому безпосередньо після зняття еластичного джгута було введено у скелетні м'язи гомілки тромбоцитарну плазму, клітинний аспірат кісткового мозку та жирової тканини. Результати гістологічних та морфометричних досліджень не показали ані позитивних, ані негативних наслідків введення клітинних суспензій щодо стану периферійних нервів.

Встановлено різні морфологічні прояви пошкодження нервових волокон: деформація мієлінової оболонки, атипово тонкі волокна, дегенерація поодиноких осьових циліндрів, ламелярні структури у нейролемоцитах, часткова деструкція ендоневрію нерва. На 30 добу експерименту виявлено тільки тенденцію зменшення щільності нервових волокон у сідничному нерві, тоді як у великогомілковому нерві виявлено атрофію окремих нервових волокон (осьових циліндрів). У роботі не виявлено ознак розвитку фіброзу, достовірного збільшення кількості колагену у стромальних елементах нерва також не виявлено, хоча R.L. Richards [169] описав значне збільшення ендоневрального колагену. Зміни, які були виявлені у периферійних нервах, можуть бути наслідком пошкодження кровоносних судин кінцівки, оскільки порушення судин (стаз, тромбоз, лізис клітин стінки судин) ми реєстрували як у міонах м'язів, так і в судинах міжм'язового простору (A. Pidlisetskyu) [15; 164]. Але ці зміни не призвели до тотальної дегенерації нерва, що

можна пояснити кількома причинами. Кровопостачання периферійних нервів кінцівки є багаторівневим, а судини у значній мірі компенсують мікроциркуляцію на різних рівнях. Пошкодження нерва через фокальну втрату перфузії є малоймовірним, оскільки колатеральні судини забезпечують достатню мікроциркуляцію у нерві (R.L. Richards) [169]. Таким чином, власні результати досліджень дозволили зробити висновок, що 6-годинна компресійна ішемія кінцівки не викликає значних структурних змін сідничного нерва, і позначається у слабкому пошкодженні периферійних нервів гомілки. Ступінь морфологічних змін нервових стовбурів залежить від рівня компресії на кінці, а введення клітинних технологій у ішемізовані м'язи кінцівки не продемонструвало достовірного впливу на розвиток структурних перебудов у периферійних нервах. Ми не виявили переконливих доказів появи морфологічних проявів регенеративних змін у нервових стовбурах, негативного впливу тромбоцитарної плазми та клітинних аспіратів кісткового мозку та жирової тканини на стан досліджуваних нервів. Ці результати суттєво доповнюють вже відомі дані щодо ураження тканин кінцівки після компресійної ішемії і дають надію на кращий ступінь збереження периферійних нервів у пошкодженій кінцівці, можливу реінервацію пошкодженої м'язової тканини.

Структурні зміни у скелетних м'язах та периферійних нервах, стан м'язової тканини після реперфузії залежать не тільки від безпосереднього механічного пошкодження, але і від вторинних змін, які полягають у метаболічній дисфункції. Відомо, що 4-годинна ішемія м'язів викликає гіперпродукцію цитотоксичного лактату, супероксид-аніону і креатинфосфокінази, що є біохімічними проявами лактат-ацидозу і ішемічного ураження тканин (T.P. Tran [200]). Гіпоксія спричиняє дефіцит кисню, що, в свою чергу, викликає гальмування транспорту електронів в дихальному ланцюзі мітохондрій та значно обмежує утворення макроергічних сполук (АТФ, креатин фосфату) в клітинах ушкоджених тканин (I. Canfora [47]). Це призводить до порушення роботи Na^+/K^+ помпи, деполяризації мембран та

внутрішньоклітинної акумуляції Ca^{2+} , в результаті чого відбувається розвиток мітохондрійної дисфункції, гіперпродукції вільних радикалів та перекисного окиснення ліпідів біологічних мембран, некрозу клітин та виникає запалення (С. Barnig [38]). Реперфузія характеризується подальшим ушкодженням ішемізованих тканин. Провідну роль при цьому відіграють активні форми кисню та продукти перекисного окиснення ліпідів та білків (М. Zamorano [191]). У відповідь на ці зміни відбувається активація ендогенних захисних механізмів, зокрема ферментативної системи антиоксидантного захисту. Відомо про зв'язок ушкодження м'язової тканини та активності цих ензимів (Т. Zhou [224]), тому аналіз змін активності ферментів цієї системи може бути використано як показник метаболічного стану та пошкодження м'язової тканини за умов введення клітинних технологій. Вивчення цих змін було окремих завданням дисертації.

Результати аналізу активності основних антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази і каталази – вказують на вірогідне зростання їх активності на 15 добу після механічної ішемії кінцівки. При цьому активність глутатіонпероксидази, пов'язана з відновлення глутатіону, навпаки, істотно знижувалась. Відомо, що цей фермент активується за присутності низьких кількостей пероксиду та ліпопероксидів, тоді як за високих концентрацій пероксиду водню активується каталаза (Y. Li and J. Jiang [116]). Таким чином, можна сказати, що на 15 добу у пошкоджених м'язах відбулось різке накопичення пероксидів, на що відреагувала каталаза і це може бути доказом вторинного (патобіохімічного) ураження м'язової тканини.

Аналіз рівня продуктів пероксидної модифікації ліпідів та протеїнів (ТБК-активних сполук, дієнових кон'югантів та похідних дифенілгідрозонію) свідчать про незначну, але достовірну нейтралізацію ТБК-реагуючих молекул антиоксидантною системою на 15 добу. В той же час привертає увагу незмінно високий рівень нітрит-аніону (у 5 разів вище за норму) протягом всього періоду експерименту. Добре відомо, що NO відіграє важливу роль, як ендотеліний

фактору релаксації, у регуляції гемодинаміки, проте, надмірна його продукція за умов реоксигенації може сприяти утворенню токсичного продукту пероксинітриту (ONOO^-), тим самим зменшуючи біодоступність самого NO. В той же час, пероксинітрит окислюється до нітриту (NO_3^-), який нітритредуктазами може бути відновлений до NO. Отже, вміст нітрит-аніону (NO_2^-) є інтегральним показником, що вказує на характер та напрямок змін продукування оксиду азоту в клітинах на тлі ішемії.

Слід зауважити, що в наших дослідженнях вміст нітрит-аніону в м'язовій тканині гомілки кроля залишався високим до закінчення експерименту, тобто протягом 30 діб. Цей факт також може свідчити про наявність запального процесу і про залучення індукованої ізоформи NO – синтази (iNOS) у формування пулу нітриту в м'язовій тканині після ішемічно-реперфузійної травми. Запальний процес, що розвивається в наслідок некрозу ушкоджених тканин, про що свідчать результати гістологічних досліджень, протікає із залученням лейкоцитів та макрофагів у вогнище запалення, при цьому NO, що продукується цими клітинами, може сприяти зростанню пулу нітриту у м'язовій тканині. Тобто навіть через 15 діб після механічної травми кінцівки скелетні м'язи потребують відновлення мікроциркуляції та корекції патобіохімічних реакцій.

Як вже зазначалось вище, введення клітин аспірату червоного кісткового мозку частково попереджало гіпотрофію м'язових волокон і сприяло елімінації продуктів некрозу. За результатами біохімічних досліджень встановлено достовірно менший рівень NO_2^- у м'язовій тканині, збільшену активність ензимів каталази та глутатіонпероксидази, що вказує на кращий рівень окисно-відновних процесів та модуляцію функціонування антиоксидантної системи. Разом з тим, збільшення продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ТБК-активних продуктів та дієнових кон'югатів) на 15 добу спостереження вказувало на збільшення перекисного окиснення ліпідів. Це може бути пов'язано як із вторинними змінами у м'язах, так і збільшенням клітинних реакцій, спрямованих на ремоделювання

сполучної тканини у ділянках некрозу м'язових волокон і тому це питання потребує подальшого вивчення.

Різниця відповіді антиоксидантної системи після введення тромбоцитарної плазми була пов'язана з достовірно більшим рівнем активності супероксиддисмутази та каталази на 5 добу, а після введення клітин аспірату жирової тканини - тільки першого ферменту у той же термін експерименту. Реакція антиоксидантної системи у цей термін може бути пов'язана із стимулюючим впливом клітинних технологій і одночасно бути реакцією м'язової тканини на їх введення. Зниження рівня активності каталази на 30 добу після введення аспірату жирової тканини може бути пов'язане з розвитком фіброзних змін у м'язах, тобто бути асоційоване з пролонгованою гіпотрофією м'язових волокон. Найбільш вагомий ефект застосування клітинних технологій полягав у зменшенні вмісту нітрит-аніону, що може опосередковано свідчити про антизапальну дію тромбоцитарної плазми і клітин аспірату кісткового мозку, але не фракції жирової тканини. Тобто з трьох порівнюваних клітинних технологій найгірші результати біохімічних досліджень були одержані за умов введення у пошкоджені м'язи гомілки стромально-васкулярної фракції жирової тканини.

З огляду на багатокomпонентність аспірату кісткового мозку досить важко дати остаточну відповідь щодо конкретних біохімічних механізмів його трофічної дії. Можна спекулятивно допускати роль цитокінової системи кісткового мозку у складі аутологічного аспірату і трофічних факторів з тромбоцитів в зменшенні запального процесу в м'язовій тканині гомілки.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально доведено, що шестигодинна турнікетна ішемія призводить до розвитку компартмент синдрому, який переходить у ішемічну контрактуру на 5 добу після епізоду ішемії;

2. При застосуванні гістологічних методик дослідження та за допомогою сонографії визначено, що тотальний та субтотальний некроз м'язів формується на 5, 15 добу після компартмент синдрому переважно у м'язах глибокого футляра гомілки експериментальних тварин;

3. Доведено, що турнікетна ішемія кінцівки викликає різко виражені структурні зміни у скелетних м'язах, які полягають у прогресуючій гіпотрофії м'язових волокон, появі новоутвореної сполучної тканини та заміщенням м'язової тканини на сполучну. Ступінь пошкодження (в першу чергу некроз м'язових волокон та розвиток фіброзних змін) та гіпотрофії є неоднорідним і більшим у субфасціальних міонах, тоді як глибокі міони характеризуються меншим рівнем пошкодження м'язових волокон і відтермінованою атрофією;

4. Кореляційний аналіз підтверджує достовірність ($P \leq 0,05$ до контролю) отриманих змін кількісних сонографічних показників в умовах впливу тяжкості ішемії на структурний стан ішемізованих м'язів, а також демонструє достовірний зв'язок між показниками некрозу м'язів та вертикальної δ -ентропії. Результати морфометричних досліджень м'язової тканини корелюють з результатами ультразвукових досліджень у ранніх стадіях формування некрозу (5 доба після турнікетної ішемії) ($r=1,00$; $p<0,001$). Тому використання сонографії з програмним забезпеченням що виховує вертикальну δ -ентропію доцільно застосовувати для діагностики локусів формування нерозів на ранніх стадіях в які в подальшому вводили концентрат тромбоцитарної плазми з терапевтичною метою;

5. У групі тварин з ішемією, яким вводили концентрат клітин червоного кісткового мозку, виявлено кращий ступінь збереження м'язових волокон у глибоких міонах і швидшу елімінацію продуктів некрозу у субфасціальних міонах. За даними морфометрії, на 5-ту добу діаметр м'язових волокон не відрізнявся від контрольних значень і був більшим від значень у групі з ішемією ($p < 0,05$). Така різниця пояснюється тим, що частина пошкоджених волокон мала більший діаметр через набряк. На 15-ту добу діаметр м'язових волокон був таким, як у групі з ішемією. На 30-ту добу кількісні значення не змінились, що оцінено як прояв затримки гіпотрофії м'язових волокон. На морфологічному рівні виявлено кращу збереженість м'язових волокон, наявність поперечної посмугованості і помірне збільшення кількості міомер.

6. У групі тварин з ішемією, яким вводили клітини жирової тканини (стромально-васкулярну фракцію) результати морфометричної оцінки кількісно підтвердили прогресуючу гіпотрофію м'язових волокон. Достовірно менший діаметр (в середньому на 15,3%, $p < 0,05$) щодо групи з ішемією встановлено на 15-ту добу після введення аспірату жирової тканини, а на 30-ту добу різниці кількісних значень не виявлено. Ці дані вказують на те, що після введення аспірату жирової тканини у ішемізований м'яз гіпотрофія розвивалася більш стрімко, тобто мала негативний наслідок.

7. Аналіз біохімічних результатів після введення клітинних технологій показав відмінності метаболічних ефектів різних клітинних суспензій. Після ішемічного пошкодження відбувалась активація ферментів антиоксидантної системи на 15-ту добу, а дія тромбоцитарної плазми прискорила активацію цієї ферментативної системи. Дія клітин кісткового мозку характеризувалась більш пролонгованою відповіддю антиоксидантної системи, а реакцію СОД на 5-ту добу після введення стромально-васкулярної фракції жирової тканини можна оцінювати як реакцію на її введення у м'язову тканину. Разом з тим, на 15-ту і 30-ту добу встановлено достовірне збільшення активності

ГП у всіх трьох групах порівняння, що вказує на активацію і відновлення роботи антиоксидантної ланки захисту на тлі ішемічного ушкодження.

8. Встановлено достовірне зменшення нітриту-аніону ($p < 0,05$) у всі три терміни експерименту після введення тромбоцитарної плазми і на 15-ту і 30-ту добу після введення концентрату клітин кісткового мозку, що можна оцінити як прояв його утилізації антиоксидантними ферментами. На 15 добу експерименту додатково виявлено збільшення ТБК-активних продуктів у групі з клітинами кісткового мозку, що оцінено як відтерміновану реакцію м'язової тканини на введення цих клітин, на появу продуктів розпаду. На 30 добу експерименту метаболічна відповідь м'язів на введення аспірату кісткового мозку вже завершилась, хоча активності каталази і рівень нітрит-аніону залишались високими. Після введення тромбоцитарної плазми додатково до зазначених показників залишалась підвищеною активність СОД. На відміну від цього, дія стромально-васкулярної фракції жирової тканини характеризувалась постійно високим вмістом у м'язій тканині нітрит-аніону, і профіль біохімічних процесів у більшій мірі був подібним до групи з ішемією. Падіння активності каталази і гіперпродукція нітрит-аніону є біохімічним проявом некрозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вишневецький, В.О. (2014). Причини, діагностичні помилки при ушкодженнях периферичних нервів кінцівок. *Запорізький Медичний Журнал*, 4(85), 50-55. <http://zmj.zsmu.edu.ua/article/view/27380>.
2. Гайко, О.Г., Долгополов, О.В., Страфун, С.С. (2013). Електроміографічна діагностика ішемічного ураження м'язів кінцівок. *Ортопедия, Травматология и Протезирование*, 1(590), 67-72. http://nbuv.gov.ua/UJRN/OpTIP_2013_1_15.
3. Гайко, О.Г. (2010). Сонографічне дослідження щільності м'язів у хворих з наслідками травми периферичних нервів верхньої кінцівки. *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 4, 57-61. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Votip_2010_4_15.
4. Григоровский, В.В. (2008). Острые травматические ишемические поражения костей: патогенез, морфогенез, дифференциальная диагностика. *Журнал НАМН України*, 1(14), 116-133.
5. Дольницький, О.В., Фідельський, В.В., Бовкун, В.М. (2010). Ішемічна контрактура Фолькмана. ч. 1. Особливості кровопостачання руки дитини. *Хірургія Дитячого Віку*, 7(2), 6-11.
6. Дрюк, Н.Ф., Киримов, В.И. (2005). Тактика лечения больных с хронической критической ишемией нижних конечностей при ограниченном некрозе тканей и образовании гнойно-некротической раны стопы. *Клінічна Хірургія*, 11/12, 23.
7. Ковалишин, Т.М., Сулима, В.С., Дубас, В.І. (2007). Профілактика ішемічних ускладнень після важкої поєднаної травми кисті та пальців. В: Матеріали наук.-практ. конф. Лікування травм верхньої кінцівки та їх наслідків; Київ, Травень 17-18.
8. Коломійцев, А.К., Чайковский, Ю.Б., Терещенко, Т.Л. (1981). Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для перафиновых и целлоидиновых срезов. *Архивы Анатомии*, 81(8), 93-96.
9. Лесков, В.Г. (1999). Діагностика та лікування компартмент-синдрому стопи. *Клінічна Хірургія*, 5, 35-37.
10. Лисин, С.В., Зверев, А.А., Латонов, В.В. (2007). Отдаленные результаты хирургического лечения хронической ишемии нижних конечностей IV стадии. *Хірургія*, 10, 44-46.
11. Лябах, А.П., Бруско, А.Т. (2002). Морфологічні зміни м'язів при ішемічній контрактурі стопи. *Проблеми Osteології*, 5(1), 14-18.

12. Лябах, А.П., Вовченко, Г.Я., Гуч, А.О. (2002). Особливості регіонарної гемодинаміки у хворих з ішемічною контрактурою стопи за даними ультразвукового дослідження. *Клінічна Хірургія*, 10, 19-23.
13. Лябах, А.П., Вовченко, Г.Я. (2002). Застосування ультразвукового дослідження в оцінці структурно-функціонального стану м'язів у хворих з ішемічною контрактурою стопи. *Клінічна Хірургія*, 3, 45-47.
14. Мак-Комас, А.Д. (2001). *Скелетные мышцы*. Киев: Олимпийская литература.
15. Підлісецький, А.Т., Долгополов, О.В., Савосько, С.І., Макаренко, О.М. (2021). Дослідження структурних змін у субфасціальній ділянці скелетних м'язів гомілки після травматичної ішемії та впливу регенеративних технологій на відновлювальні процеси (експериментальне дослідження). *Ортопедія, Травматологія та Протезування*, 4, 63-69. <http://otp-journal.com.ua/article/view/251432>.
16. Сорокин, Ю.Н., Сагарадзе, С.А., Мельников, А.В. (2014). Острая ишемическая нейропатия. *Міжнародний Неврологічний Журнал*, 2(64), 100-105.
17. Стецула, В.И., Боер, В.А., Колотилов, Н.Н. (1978). Изменения электрических параметров костного мозга при острой ишемии конечности в эксперименте. *Ортопедия, Травматология и Протезирование*, 9, 19-24.
18. Страфун, С.С., Бруско, А.Т., Долгополов, О.В., Боер, В.А. (2008). Вплив гострої артеріальної ішемії кінцівки на зміни підфасціального та внутрішньокісткового тисків в експерименті. *Літопис Травматології та Ортопедії*, 12, 9-12. <https://docplayer.net/39874872-Litopis-travmatologiyi-ta-ortopediyi.html>.
19. Страфун, С.С., Бруско, А.Т., Долгополов, О.В., Боер, В.А. (2007). Зміни підфасціального та внутрішньокісткового тиску в умовах гострої турнікетної ішемії кінцівки в експерименті. *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 4, 9-13.
20. Страфун, С.С., Бруско, А.Т., Лябах, А.П. та ін. (2007). *Профілактика, діагностика та лікування ішемічних контрактур кисті та стопи*. Київ: Стилос.
21. Страфун, С.С., Гайович, В.В., Долгополов, О.В. (2013). Відновлення функції стопи в пацієнтів з ішемічною контрактурою та ушкодженням периферичних нервів нижньої кінцівки. *Травма*, 14(6), 83-89. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Travma_2013_14_6_17.

22. Страфун, С.С., Грицай, М.П., Вовченко, А.Я., Гайко, О.Г., Курінний, І.М., Долгополов, О.В.. Ультразвукова діагностика післятравматичних ішемічних ушкоджень гомілки внаслідок перелому її кісток. *Травма*, 12(2), 28-32. <http://www.mif-ua.com/archive/article/21731>.
23. Страфун, С.С., Долгополов, О.В. (2012). Лікування закритих переломів кісток кінцівок у пацієнтів з післятравматичними ішемічними ушкодженнями. *Літопис Травматології та Ортопедії*, 1-2, 62. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lto_2012_1-2_20.
24. Страфун, С.С., Долгополов, О.В. (2012). Проблеми лікування високоенергетичних ушкоджень, ускладнених посттравматичною ішемією кінцівок. *Травма*, 13(2), 166-172. <http://www.mif-ua.com/archive/article/31059>.
25. Страфун, С.С., Курінний, І.М., Гайко, О.Г. (2006). Тактика хірургічного лікування хворих з наслідками ушкоджень периферичних нервів верхньої кінцівки. *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 1, 18-24.
26. Страфун, С.С., Нікітін, П.В., Солдатенко, С.В. (2014). Використання високих доз L-лізину есцинату в лікуванні компартмент-синдрому при переломах кісток кінцівок. *Здоров'я України*, 5, 18.
27. Страфун, С.С., Нікітін, П.В., Солдатенко, С.В. (2005). Консервативна терапія у комплексному лікуванні місцевого гіпертензивного ішемічного синдрому (компартмент-синдрому) при переломах кісток кінцівок. *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 2, 39-42.
28. Страфун, С.С., Підлісецький, А.Т., Савосько, С.І., Гайовий, І.В., Долгополов, О.В. (2021). Ультрасонографічне дослідження скелетних м'язів в умовах травматичної ішемії. *Журнал Національної Академії Медичних Наук України*, 27(2), 110-117. <http://journal.amnu.gov.ua/archive-ua/2021-27-2>.
29. Страфун, С.С., Тимошенко, С.В., Лопайчук, В.О. (2003). Оцінка ефективності профілактики та лікування місцевого гіпертензивного ішемічного синдрому (компартментсиндром) шляхом моніторингу підфасціального тиску у хворих з переломами кісток кінцівок. *Травма*, 4(4), 413-416.
30. Страфун, С.С. (2002). Профілактика, діагностика та лікування ішемічних контрактур кисті та стопи. *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 2, 85-88.
31. Agarwal, P., Gupta, M., Kukrele, R., Sharma, D. (2020). Tibialis posterior (TP) tendon transfer for foot drop: A single center experience. *Journal of*

- Clinical Orthopaedics & Trauma*, 11(3), 457-461. doi: 10.1016/j.jcot.2020.03.007. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32405209; PMCID: PMC7211814.
32. Alam, F., & Choudhury, S. (2017). Effect of physiotherapy on pain, range of motion, grip strength and function of hand in distal radius fracture with Volkmann's ischemic contracture, Grade II - A case report. *International Journal of Health Sciences and Research*, 7(10), 278-282.
 33. Al-Rubeai, M., & Naciri, M. (2014). *Stem cells and cell therapy*. Springer.
 34. Asplund, M., Nilsson, M., Jacobsson, A., von Holst, H. (2009). Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology*, 32(3), 217-228. doi: 10.1159/000197900. Epub 2009 Jan 28.
 35. Balakrishnan, G. (2006). Ischaemic contracture of the hand. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 39, 94-102. DOI:10.4103/0970-0358.26917.
 36. Balice-Gordon, R.J. (1996). Schwann cells: Dynamic roles at the neuromuscular junction. *Current Biology*, 6(9), 1054-1056. doi: 10.1016/s0960-9822(02)70662-3.
 37. Ball, A., Perreault, T., Fernández-de-Las-Peñas, C., Agnone, M., Spennato, J. (2022). Ultrasound confirmation of the multiple loci hypothesis of the myofascial trigger point and the diagnostic importance of specificity in the elicitation of the local twitch response. *Diagnostics (Basel)*, 12(2), 321. doi: 10.3390/diagnostics12020321.
 38. Barnig, C., Lutzweiler, G., Giannini, M., Lejay, A., Charles, A.L., Meyer, A. et al. (2022). Resolution of Inflammation after Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion Injury: A Focus on the Lipid Mediators Lipoxins, Resolvins, Protectins and Maresins. *Antioxidants (Basel)*, 11(6):1213. doi: 10.3390/antiox11061213.
 39. Bass, A., Beranek, R., Drahota, Z., Gutmann, E., Hnik, P., Hudlicka, O. et al. E. Gutmann (Eds.). (1962). *The denervated muscle*. Prague: Pub. House of the Czechoslovak Academy of Sciences.
 40. Benabdallah, O., Shimi, M., Ait Benali, H., Khamlichi, A., Benabdallah, R. (2021). Management of Volkmann's ischemic contracture: Case series of 32 patients. *SICOT Journal*, 7, 56. doi: 10.1051/sicotj/2021055. Epub 2021 Nov 11.
 41. Bianco-Batlles, M.D., Sosunov, A., Polin, R.A., Ten, V.S. (2008). Systemic inflammation following hind-limb ischemia-reperfusion affects brain in neonatal mice. *Developmental Neuroscience*, 30(6), 367-373. doi: 10.1159/000164686. Epub 2008 Oct 15.

42. Birch, R. (2011). *Surgical disorders of the peripheral nerves*. London: Springer.
43. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *May 7*;72, 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
44. Braga-Silva, J., Gehlen, D., Padoin, A.V. (2008). Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, *33*(4), 488-493. doi: 10.1177/1753193408090401.
45. Bunnell, B., & Gimble, J. (Eds.). (2018). *Adipose-derived stem cells: Methods and protocols*. Springer.
46. Gage, F.H. (1998). Cell therapy. *Nature*, *392*(6679 Suppl), 18-24.
47. Canfora, I., Tarantino, N., & Pierno, S. (2022). Metabolic pathways and ion channels involved in skeletal muscle atrophy: A starting point for potential therapeutic strategies. *Cells*, *11*(16), 2566. <https://doi.org/10.3390/cells11162566>.
48. Carlson, B.M. (2014). The biology of long-term denervated skeletal muscle. *European Journal of Translational Myology*, *24*(1), 3293. doi: 10.4081/ejtm.2014.3293. eCollection 2014 Mar 31.
49. Castillo-Galván, M.L., Martínez-Ruiz, F.M., Garza-Castro, Ó., Elizondo-Omaña, R.E., Guzmán-López, S. (2014). Study of peripheral nerve injury in trauma patients. *Gaceta Medica de Mexico*, *150*(6), 527-532.
50. Ceafalan, L.C., Fertig, T.E., Popescu, A.C., Popescu, B.O., Hinescu, M.E., Gherghiceanu, M. (2018). Skeletal muscle regeneration involves macrophage-myoblast bonding. *Cell Adhesion and Migration*, *4*, 12(3), 228-235. doi: 10.1080/19336918.2017.1346774. Epub 2017 Aug 30.
51. Chamisa, I. (2008). Secondary abdominal compartment syndrome in a patient with isolated extraperitoneal injuries. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, *34*(3), 313-314. doi: 10.1007/s00068-008-7092-2.
52. Chellini, F., Tani, A., Zecchi-Orlandini, S., Sassoli, C. (2019). Influence of platelet-rich and platelet-poor plasma on endogenous mechanisms of skeletal muscle repair/regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 683. doi: 10.3390/ijms20030683.
53. Conry, K.T., Weinberg, D.S., Wilber, J.H., Liu, R.W. (2021). Assessment of Splinting Quality: A Prospective Study Comparing Different Practitioners. *Iowa Orthopaedics Journal*, *41*(1), 155-161. PMID: 34552418; PMCID: PMC8259183.

54. Corfas, G., Velardez, M.O., Ko, C.-P., Ratner, N., Peles, E. (2004). Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9250-9260. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3649-04.2004.
55. Court, F.A., Gillingwater, T.H., Melrose, S., Sherman, D.L., Greenshields, K.N., Morton, J.A. et al. (2008). Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 23), 3901-3911. doi: 10.1242/jcs.031047. Epub 2008 Nov 11.
56. Cuevas, P., Carceller, F., Garcia-Gomez, I., Yan, M., Dujovny, M. (2004). Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurological Research*, 26(2), 230-232. doi: 10.1179/016164104225013897.
57. Cunha, M.S., Silva, J.C.F. da, Nakamoto, H.A., Ferreira, M.C. (2005). Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: Effect of allopurinol and streptokinase. *Clinics (Sao Paulo)*, 60(3):213-220. doi: 10.1590/s1807-59322005000300006. Epub 2005 Jun 13.
58. Daoutis, N.K, Gerostathopoulos, N.E., & Efstathopoulos, D.G. (1994). Microsurgical reconstruction of large nerve defects using autologous nerve grafts. *Microsurgery*, 15(7), 502-505. doi: 10.1002/micr.1920150713.
59. Del Giudice, C., Van Den Heuvel, D., Wille, J., Mirault, T., Messas, E., Ferraresi, R., Kum, S., & Sapoval, M. (2018). Percutaneous Deep Venous Arterialization for Severe Critical Limb Ischemia in Patients With No Option of Revascularization: Early Experience From Two European Centers. *Cardiovascular and Interventional Radiology*, 41(10), 1474-1480. <https://doi.org/10.1007/s00270-018-2020-2>
60. Dodd, A., & Le, I. (2013). Foot compartment syndrome: diagnosis and management. *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgery*, 21(11):657-664. doi: 10.5435/JAAOS-21-11-657.
61. Dong, X., Xing, Q., Li, Y., Han, X., Sun, L. (2014). Dexmedetomidine protects against ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*, 186(1), 240-245. doi: 10.1016/j.jss.2013.07.052. Epub 2013 Aug 19.
62. Drysch, M., Wallner, C., Schmidt, S.V., Reinkemeier, F., Wagner, J.M., Lehnhardt, M., Behr, B. et al. (2019). An optimized low-pressure tourniquet murine hind limb ischemia reperfusion model: Inducing acute ischemia reperfusion injury in C57BL/6 wild type mice. *PLoS One*, 14(1):e0210961. doi: 10.1371/journal.pone.0210961. eCollection 2019.

63. Duehrkop, C., & Rieben, R. (2014). Refinement of tourniquet-induced peripheral ischemia/reperfusion injury in rats: Comparison of 2h vs 24h reperfusion. *Lab Animal*, 48(2),143-154. doi: 10.1177/0023677213516313.
64. Ekinci Akdemir, F.N., Gülçin, İ., Karagöz, B., Soslu, R., Alwasel, S.H. (2016). A comparative study on the antioxidant effects of hesperidin and ellagic acid against skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup4), 114-118. doi: 10.1080/14756366.2016.1220378. Epub 2016 Aug 23.
65. El-Kadiry, A.E., Lumbao, C., Salame, N., Rafei, M., Shammaa, R. (2022). Bone marrow aspirate concentrate versus platelet-rich plasma for treating knee osteoarthritis: a one-year non-randomized retrospective comparative study. *BMC Musculoskelet Disord*, 23(1), 23. doi: 10.1186/s12891-021-04910-5.
66. Elshaer, S.L., Lorys, R.E., & El-Remessy, A.B. (2016). Cell therapy and critical limb ischemia: evidence and window of opportunity in obesity. *Obesity & Control Therapy*, 3(1), 121. doi: 10.15226/2374-8354/3/1/00121. Epub 2016 Sep 15.
67. Fess, E., Gettle, K., Philips, C., Janson, J. (2004). *Hand and upper extremity splinting: Principles and methods*. Mosby.
68. Fess E. E. (2002). A history of splinting: To understand the present, view the past. *Journal of Hand Therapy*, 15(2), 97–132. <https://doi.org/10.1053/hanthe.2002.v15.0150091>
69. Fletcher, M.D., Spicer, D., & Warren, P.J. (2001). Delayed presentation of compartment syndrome following gastrocnemius tear. *Acta Orthopaedica Belgica*, 67(2), 190-192.
70. Forcina, L., Cosentino, M., & Musarò, A. (2020). Mechanisms regulating muscle regeneration: Insights into the interrelated and time-dependent phases of tissue healing. *Cells*, 9(5), 1297. doi: 10.3390/cells9051297. PMID: 32456017; PMCID: PMC7290814.
71. Frey, S.P., Jansen, H., Raschke, M.J., Meffert, R.H., Ochman, S. (2012). VEGF improves skeletal muscle regeneration after acute trauma and reconstruction of the limb in a rabbit model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 470(12), 3607-3614.
72. Gaiovych, I., Savosko, S., Labunets, I., Utko, N., Makarenko, A., Chaikovsky, Y. (2019). Sciatic nerve regeneration after autografting and application of the bone marrow aspirate concentration. *Georgian Medical News*, 295, 145-152.

73. Goel, R.K., Suri, V., & Suri, A. (2009). Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *Journal of Clinical Neuroscience*, *16*(9), 1211-1217. doi: 10.1016/j.jocn.2009.01.031. Epub 2009 Jul 10.
74. Goncharuk, O., Savosko, S., Tykhomyrov, A., Guzyk, M., Medvediev, V., Tsymbaliuk, V. et al. (2023). Matrix Metalloproteinase-9 is involved in the fibrotic process in denervated muscles after sciatic nerve trauma and recovery. *Journal of Neurological Surgery Part A: Central European Neurosurgery*, *84*(2), 116-122. doi: 10.1055/s-0041-1731750.
75. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *126*(1), 131-138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x.
76. Griffin, M.F., Malahias, M., Hindocha, S., Khan, W.S. (2014). Peripheral nerve injury: Principles for repair and regeneration. *Open Orthopaedics Journal*, *8*(1), 199-203. doi: 10.2174/1874325001408010199. eCollection 2014.
77. Grinsel, D., & Keating, C.P. (2014). Peripheral nerve reconstruction after injury: A review of clinical and experimental therapies. *BioMed Research International*, *2014*(4), 698256, 1-13. doi: 10.1155/2014/698256. Epub 2014 Sep 3.
78. Gulaya, N.M., Kuzmenko, A.I., Margitich, V.M., Govseeva, N.M., Melnichuk, S.D., Goridko, T.M. et al. (1998). Long-chain N-acyl ethanolamines inhibit peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia. *Chemistry and Physics of Lipids*, *97*(1), 49-54.
79. Guo, Y.X., Wang, G.Y., Cheng, W.J., Yan, C.Z., Zhao, S., Li, Z et al. (2021). Activation of opioid receptors attenuates ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle induced by tourniquet placement. *Mediators of Inflammation*, *Jan 15*, 6699499. doi: 10.1155/2021/6699499. eCollection 2021.
80. Gutmann, E., & Zelena, J. (1959). Comparative studies of muscle atrophy. *Babakova Sbirka*, *16*, 147.
81. Haack-Sørensen, M., Follin, B., Juhl, M., Brorsen, S.K., Søndergaard, R.H., Kastrup, J. et al. (2016). Culture expansion of adipose derived stromal cells. A closed automated quantum cell expansion system compared with manual flask-based culture. *Journal of Translational Medicine*, *14*(1), 319. doi: 10.1186/s12967-016-1080-9.

82. Hadwan, M.H, & Abed, H.N. (2015). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Brief*, 6, 194-199. doi: 10.1016/j.dib.2015.12.012. eCollection 2016 Mar.
83. Halanski, M.A., Morris, M.R., Lee Harper, B., Doro, C. (2015). Intracompartmental pressure monitoring using a handheld pressure monitoring system. *JBJS Essential Surgical Techniques*, 5(1), e6. doi: 10.2106/JBJS.ST.N.00020. eCollection 2015 Feb 25.
84. Hargens, A.R., Schmidt, D.A., Evans, K.L., Gonsalves, M.R., Cologne, J.B., Garfin, S.R. et al. (1981). Quantitation of skeletal-muscle necrosis in a model compartment syndrome. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 63(4), 631-636.
85. Harriman, D.G. (1977). Ischaemia of peripheral nerve and muscle. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (R Coll Pathol)*, 11, 94-104. doi: 10.1136/jcp.s3-11.1.94.
86. Harris, J.B. (2003). Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon*, 42(8), 933-945. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.011.
87. Hathaway, P.W., Engel, W.K., & Zellweger, H. (1970). Experimental myopathy after microarterial embolization: Comparison with childhood X-linked pseudohypertrophic muscular dystrophy. *Archives of Neurology*, 22(4), 365-378. doi: 10.1001/archneur.1970.00480220079011.
88. Hepple, R.T., & Rice, C.L. (2016). Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 594(8), 1965-1978. doi: 10.1113/JP270561. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26437581; PMCID: PMC4933121.
89. Heslop, J.A., Hammond, T.G., Santeramo, I. Tort Piella, A., Hopp, I., Zhou, J., ... Park, B.K. (2015). Concise review: workshop review: Understanding and assessing the risks of stem cell-based therapies. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(4),389-400. doi: 10.5966/sctm.2014-0110. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25722427; PMCID: PMC4367503.
90. Hogendoorn, S., Duijnsveld, B.J., van Duinen, S.G., Stoel, B.C., van Dijk, J.G., Fibbe W., Nielsen, R. (2014). Local injection of autologous bone marrow cells to regenerate muscle in patients with traumatic brachial plexus injury. *Bone and Joint Research*, 3(2), 38-47. doi: 10.1302/2046-3758.32.2000229. Print 2014.
91. Hori, K., Tsujii, M., Iino, T., Satonaka, H., Uemura, T., Akeda, K., Hasegawa, M., Uchida, A., Sudo, A. (2013). Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in

- murine hindlimb. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14, 113. doi: 10.1186/1471-2474-14-113.
92. Horta, R., Oliveira, N., Ferreira, M.C., Nascimento, R., Silva, A. (2019). Reconstruction of a chronic Volkmann contracture following forearm revascularization with Burkhalter's procedure and fractional flexor tendon lengthening after a Failed Stiles-Bunnell transfer. *Journal of Hand and Microsurgery*, 11(Suppl 1), S36-S41. doi: 10.1055/s-0039-1683457. Epub 2019 Apr 17.
93. Houdek, M.T., Wyles, C.C., Smith, J.H., Terzic, A., Behfar, A., Sierra, R.J. (2021). Hip decompression combined with bone marrow concentrate and platelet-rich plasma for corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head: mid-term update from a prospective study. *Bone & Joint Open*, 2(11), 926-931. doi: 10.1302/2633-1462.211.BJO-2021-0132.R1.
94. Ikebe, K., Kato, T., Yamaga, M., Hirose, J., Tsuchida, T., Takagi, K. (2001). Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. *Journal of Surgical Research*, 99(1), 1-6. doi: 10.1006/jsre.2001.6134.
95. Inoue, M., & Toyoda, K. (2021). Expanding the therapeutic window in acute ischemic stroke by advanced imaging. *Vessel Plus*, 5, 11. <http://dx.doi.org/10.20517/2574-1209.2020.99>
96. Ismail, A.M., Abdou, S.M., Aty, H.A., Kamhawy, A.H., Elhinedy, M., Elwageh, M., Taha, A., Ezzat, A., Salem, H.A., Youssif, S., Salem, M.L. (2016). Autologous transplantation of CD34(+) bone marrow derived mononuclear cells in management of non-reconstructable critical lower limb ischemia. *Cytotechnology*, 68(4), 771-781. doi: 10.1007/s10616-014-9828-7. Epub 2014 Dec 16.
97. Jacobs, M., & Austin, N. (Eds.). (2002). *Hand and upper extremity splinting: Principles and process*. Lippincott Williams & Wilkins.
98. Jepson, P. N. (1975). The classic. Ischemic contracture experimental study by Paul N. Jepson, M.D. *Clinical orthopaedics and related research*, 113, 3-7.
99. Jonsson, S., Wiberg, R., McGrath, A.M., Novikov, L.N., Wiberg, M., Novikova, L.N., Kingham, P. (2013). Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS One*, 8(2), e56484. doi: 10.1371/journal.pone.0056484. Epub 2013 Feb 7.

100. Kaku, D.A., Malamut, R.I., Frey, D.J., Parry, G.J. (1993). Conduction block as a nearly sign of reversible injury in ischemic monomelic neuropathy *Neurology*, 43(6), 1126-1130. doi: 10.1212/wnl.43.6.1126.
101. Kalyani, B.S., Fisher, B.E., Roberts, C.S., Giannoudis, P.V. (2011). Compartment syndrome of the forearm: a systematic review. *Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 36(3), 535-543. doi: 10.1016/j.jhsa.2010.12.007.
102. Keynes, R.D., Aidley, D.J., & Huang, C.L.-H. (2012). *Nerve and muscle* (4th ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
103. Kılıç, Y., Özer, A., Tatar, T., Zor, M.H., Kirişçi, M., Kartal, H., Dursun, A., Billur, D., Arslan, M., Kucuk, A. (2017). Effect of picoside II on hind limb ischemia reperfusion injury in rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 1917-1925. doi: 10.2147/DDDT.S132401. eCollection 2017.
104. Kim, J.G., Lee, J., Roe, J., Tromberg, B.J., Brenner, M., Walters, T.J. (2009). Hemodynamic changes in rat leg muscles during tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury observed by near-infrared spectroscopy. *Physiological Measurement*, 30(7), 529-540. doi: 10.1088/0967-3334/30/7/001. Epub 2009 May 13.
105. Kim, S.J., Kim, E.K., Kim, S.J., Song, D.H. (2018). Effects of bone marrow aspirate concentrate and platelet-rich plasma on patients with partial tear of the rotator cuff tendon. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 13(1), 1. doi: 10.1186/s13018-017-0693-x.
106. Kingham, P.J., & Terenghi, G. (2006). Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *Journal of Anatomy*, 209(4), 511-26. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00623.x.
107. Kudykin, M.N., Sheiko, G.E., & Belova, A.N. (2021). Peripheral neuropathy in critical limb ischemia. *Flebologiya*, 15(3), 162. DOI:10.17116/flebo202115031162.
108. Küllmer, K., Olivier, L., Eysel, P., Rompe, J.D., Schmit-Neuerburg, K.P. (1997). Traumatically-induced compartment syndrome of the tibia. Ultrasound diagnosis for qualitative assessment of late sequelae of musculature after dermatofasciotomy. *Die Unfallchirurgie*, 23(3), 87-91. doi: 10.1007/BF02628912.
109. Kumar, A.A., Kumar, S.R., Narayanan, R., Arul, K., Baskaran, M. (2009). Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury: a phase I/II clinical safety and primary efficacy data. *Experimental and Clinical Transplantation*, 7(4), 241-248.

110. Kuroda, Y., Togashi, H., Uchida, T., Haga, K., Yamashita, A., Sadahiro, M. (2020). Oxidative stress evaluation of skeletal muscle in ischemia–reperfusion injury using enhanced magnetic resonance imaging. *Scientific Reports*, *10*(1), 10863. doi: 10.1038/s41598-020-67336-4.
111. Lad, S.P., Nathan, J.K., Schubert, R.D., Boakye, M. (2010). Trends in median, ulnar, radial, and brachio-plexus nerve injuries in the United States. *Neurosurgery*, *66*(5), 953-960. doi: 10.1227/01.neu.0000368545.83463.91.
112. Lalegül-Ülker, Ö., Şeker, Ş., Elçin, A.E., Elçin, Y.M. (2019). Encapsulation of bone marrow-MSCs in PRP-derived fibrin microbeads and preliminary evaluation in a volumetric muscle loss injury rat model: modular muscle tissue engineering. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *47*(1), 10-21. doi: 10.1080/21691401.2018.1540426. Epub 2018 Dec 4.
113. Langridge, B., Griffin, M., & Butler, P.E. (2021). Regenerative medicine for skeletal muscle loss: a review of current tissue engineering approaches. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *32*(1), 15. doi: 10.1007/s10856-020-06476-5.
114. Lee, S.K., & Wolfe, S.W. (2000). Peripheral nerve injury and repair. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *8*(4), 243-252.
115. Leroux, L., Descamps, B., Tojais, N.F., Séguy, B., Oses, P., Moreau, C., Daret, D., Ivanovic, Z., Boiron, J.-M., Lamaziere, J.-M.D., Dufourq, P., Couffibhal, T., Duplaa, C. (2010). Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Molecular Therapy*, *18*(8), 1545-1552. doi: 10.1038/mt.2010.108. Epub 2010 Jun 15.
116. Li, Y., Jiang, J., Tong, L., Gao, T., Bai, L., Xue, Q., Xing, J., Wang, Q., Lyu, H., Cai, M., Sun, Z. (2020). Bilobalide protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammatory responses via the MAPK/NF- κ B pathways in rats. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *21*(1), 449. doi: 10.1186/s12891-020-03479-9. PMID: 32646398; PMCID: PMC7350583.
117. Li, Z.J., Wang, L.Q., Li, Y.Z., Wang, C.Y., Huang, J.Z., Yu, N.Z., Long, X. (2021). Application of adipose-derived stem cells in treating fibrosis. *World Journal of Stem Cells*, *13*(11), 1747-1761. doi: 10.4252/wjsc.v13.i11.1747. PMID: 34909121; PMCID: PMC8641015.
118. Liew, A., & O'Brien, T. (2012). Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Research & Therapy*, *3*(4), 28. doi: 10.1186/s119.

119. Lin, Y., Li, G., & Liao, J. (2017). *Adipose-derived stem cells (ASCs): Clinical applications, biological characteristics and therapeutic potential in regenerative medicine (Stem Cells: Laboratory and Clinical Research)*. Nova Science Pub.
120. Liu, J., Wang, Y., Akamatsu, Y., Lee, C.C., Stetler, R.A., Lawton, M.T., Yang, G.Y. (2014). Vascular remodeling after ischemic stroke: Mechanisms and therapeutic potentials. *Progress in Neurobiology*, 115, 138-156. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.004. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24291532; PMCID: PMC4295834.
121. Liu, W., Wei-LaPierre, L., Klose, A., Dirksen, R.T., Chakkalakal, J.V. (2015). Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions. *Elife*, 4, e09221. doi: 10.7554/eLife.09221.
122. Liu, Z.Y., Chen, Z.B., & Chen, J.H. (2018). A novel chronic nerve compression model in the rat. *Neural Regeneration Research*, 13(8), 1477-1485. doi: 10.4103/1673-5374.235306.
123. Lundborg, G. (1972). Limb ischemia and nerve injury. *Archives of Surgery*, 104(5), 631-632. doi: 10.1001/archsurg.1972.04180050007001.
124. Lyabah, A.P., & Vovchenko, G.Ya. (2002). The use of ultrasound in assessing the structural and functional state of muscles in patients with ischemic foot contracture. *Clinical Surgery*, 3, 45-47.
125. Machado, E.S., Soares, F.P., Yamaguchi, R.S., Felipone, W., Meves, R., Souza, T., Topolnial, R., Caldas, J., Abreu, E., Neto, L., Pichemel, P., Bredemeier, M. (2022). A simple double-spin closed method for preparing platelet-rich plasma. *Cureus*, 14(1), e20899. doi: 10.7759/cureus.20899. eCollection 2022 Jan.
126. Mackinnon, S.E., & Yee, A. (2015). *Nerve surgery*. New York: Thieme. DOI: 10.1055/b-003-106416
127. Mackinnon, S.E., & Dellon, A.L. (1988). *Nerve repair and nerve grafts. Surgery of the peripheral nerve*. New York: Thieme.
128. Mahdy, M.A., Lei, H.Y., Wakamatsu, J., Hosaka, Y.Z., Nishimura, T. (2015). Comparative study of muscle regeneration following cardiotoxin and glycerol injury. *Annals of Anatomy*, 202, 18-27. doi: 10.1016/j.aanat.2015.07.002.
129. Malahias, M.A., Chytas, D., Babis, G.C., Nikolaou, V.S. (2014). Platelet-rich plasma guided injections: clinical application in peripheral neuropathies. *Frontiers in Surgery*, October 13, 1, 41. doi: 10.3389/fsurg.2014.00041. eCollection 2014.

130. Marques, M.J., de Carvalho, C. L. T., Minatel, E, Neto, H.S. (2006) Terminal Schwann cell distribution at the neuromuscular junction of the dystrophin-deficient MDX mice. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 23(1), 217-222.
131. Matsen, F.A., Mayo, K.A., Krugmire, R.B., Sheridan, G., Kraft, G. (1977). A model compartmental syndrome in man with particular reference to the quantification of nerve function. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 59, 648–53 PMID: 141451.
132. Matsumoto, D.E., & Baker, J.H. (1987). Degeneration and alteration of axons and intrafusal muscle fibers in spindles following tenotomy. *Experimental Neurology*, 97(3), 482-498. doi: 10.1016/0014-4886(87)90108-7.
133. Mazzotta, A., Stagni, C., Rocchi, M., Rani, N., Del Piccolo, N., Filardo, G., Dallari, D. (2021). Bone marrow aspirate concentrate/platelet-rich fibrin augmentation accelerates healing of aseptic upper limb nonunions. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 22(1), 21. doi: 10.1186/s10195-021-00582-y.
134. McCormack, M.C., Kwon, E., Eberlin, K.R., Randolph, M., Friend, D.S., Thomas, A.C., Watkins, M., Austen, W. (2008). Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury. *Surgery*, 143(1), 126-133. doi: 10.1016/j.surg.2007.06.005. Epub 2007 Dec 3.
135. Mackinnon, S. E. (2002). Pathophysiology of nerve compression. *Hand Clinics*, 18(2), 231-241. [https://doi.org/10.1016/s0749-0712\(01\)00012-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0712(01)00012-9)
136. Maffulli, N. (2016). *Platelet rich plasma in muscoskeletal practice*. Springer.
137. Meena, D.K., Thalanki, S., Patni, P., Meena, R.K., Bairawa, D., Bhatia, C. (2016). Results of neurolysis in established upper limb Volkmann's ischemic contracture. *Indian Journal of Orthopaedics*, 50(6), 602-609. doi: 10.4103/0019-5413.193483.
138. Melincovici, C., Bosca, A., Susman, S., Marginean, M., Mihiu, C., Istrate, M., Moldovan, I.-M., Roman, A., Mihiu, C. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(2), 455-467.
139. Miranda-Klein, J., Howel, C.M., & Davis-Cheshire, M.D.-C. (2020). Recognizing and managing upper extremity compartment syndrome. *JAAPA*, 33(5), 15-20.

140. Mirza, T.M., & Shrestha, A.B. (2020). Volkmann contracture. In: Stat Pearls Publishing [Internet]. Treasure Island (FL): 2020 Jun; StatPearls Publishing 2021. PMID: 32491686.
141. Morris, J.L., Letson, H.L., McEwen, P., Biros, E., Dlaska, C., Hazratwala, K., Wilkinson, M., Dobson, G. (2021). Intra-articular adenosine, lidocaine and magnesium (ALM) solution decreases postoperative joint fibrosis in an experimental knee implant model. *Translational Medicine Communications*, 6, 4. <https://doi.org/10.1186/s41231-021-00084-3>
142. Müller, M.E., Koch, P., Nazarian, S., Schatzker, J. (1990). *The comprehensive classification of fractures of long bones*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61261-9>.
143. Murakami, T., Hino, S.-I., Saito, A., Imaizumi, K. (2007). Endoplasmic reticulum stress response in dendrites of cultured primary neurons. *Neuroscience*, 146(1), 1-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.01.069. Epub 2007 Mar 23.
144. Murdock, M., & Murdoch, M.M. (2012). Compartment syndrome: A review of the literature. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 29(2), 301-310.
145. Muthuraman, A., Ramesh, M., & Sood, S. (2010). Development of animal model for vasculatic neuropathy: Induction by ischemic-reperfusion in the rat femoral artery. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(2), 215-221. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.12.004. Epub 2009 Dec 21.
146. Nishikimi, M., Appaji, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854. doi: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3.
147. Noble, J., Munro, C.A., Prasad, V.S., Midha, R. (1998). Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *Journal Trauma*, 45(1), 116-122. doi: 10.1097/00005373-199807000-00025.
148. Novak, C.B., Anastakis, D.J., Beaton, D.E., Mackinnon, S.E., Katz, J. (2011). Biomedical and psychosocial factors associated with disability after peripheral nerve injury. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 93(10), 929-936. doi: 10.2106/JBJS.J.00110.
149. Nukada, H., van Rij, A.M., Packer, S.G., McMorran, P.D. (1996). Pathology of acute and chronic ischemic neuropathy in atherosclerotic peripheral vascular disease. *Brain*, 119(Pt 5), 1449-1460. doi: 10.1093/brain/119.5.1449.
150. Nukada, H. (1990). Ischemic neuropathy. *Rinsho Shinkeigaku*, 30(12), 1368-1370.

151. O'Brien, M. (2010). *Aids to the examination of the peripheral nervous system* (5th ed.). Philadelphia: Saunders.
152. Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5488-5491.
153. Osborn, C.P.M., & Schmidt, A.H. (2020). Management of acute compartment syndrome. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 28(3):e108-e114.
154. Ovais, H., Adil, H., Beenish, M., Abdul, R. (2018). Peripheral nerve injuries - an analysis of 75 cases. *Pulsus Journal of Surgical Research*, 2(1), 34-39.
155. Ozer, K. (2020). Nerve lesions in Volkmann ischemic contracture. *Journal of Hand Surgery (American Volume)*, 45(8), 746-757. doi: 10.1016/j.jhsa.2020.03.027.
156. Pang, C.Y., & Forrest, C.R. (1995). Acute pharmacologic preconditioning as a new concept and alternative approach for prevention of skeletal muscle ischemic necrosis. *Biochemical Pharmacology*, 49(8), 1023-1034. doi: 10.1016/0006-2952(94)00467-z.
157. Paoletta, M., Moretti, A., Liguori S., Snichelotto, F., Menditto, I., Toro, G., Gimiglian, F., Iolascon, G. (2021). Ultrasound imaging in sport-related muscle injuries: pitfalls and opportunities. *Medicina (Kaunas)*, 57(10), 1040. doi: 10.3390/medicina57101040.
158. Paradis, S., Charles, A.L., Meyer, A., Lejay, A., Scholey, J., Chakfe, N., Zoll, J., Geby, B. (2016). Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 310(11), C968-C982. doi: 10.1152/ajpcell.00356.2015.
159. Park, H.T., Kim, J.K., & Tricaud, N. (2019). The conceptual introduction of the “demyelinating Schwann cell” in peripheral demyelinating neuropathies. *Glia*, 67(4), 571-581. doi: 10.1002/glia.23509. Epub 2018 Oct 30.
160. Pereslegina, I.A. (1989). The activity of antioxidant enzymes in the saliva of normal children. *Laboratornoe Delo*, 11, 20-23.
161. Pidlisetsky, A. (2021). Peripheral nerve lesions after a mechanically induced limb ischemia. *Georgian Medical News*, 310, 165-169.
162. Pidlisetsky, A.T., Kosiakova, G.V., Goridko, T.M., Berdyshev, A.G., Meged, O.F., Savosko, S.I., Dolgoplov, O.V. (2021). Administration of platelet-rich plasma or concentrated bone marrow aspirate after mechanically induced ischemia improves biochemical parameters in

- skeletal muscle. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(3), 30-38. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.030>.
163. Pidlisetskyi, A. (2021). Damages of neuromuscular system after mechanical-induced limb ischemia (experimental study). *Herald of Orthopedics, Traumatology and Prosthetics*, 2(109), 58-62. <https://doi.org/10.37647/0132-2486-2021-109-2-58-62>.
 164. Pidlisetskyi, A., Savosko, S., Dolhopolov, O., Makarenko, O. (2021). Peripheral nerve lesions after a mechanically induced limb ischemia. *Georgian Medical News*, 310, 165-169. PMID: 33658426.
 165. Preston, D.C., & Shapiro, B.E. (2002). Needle electromyography. Fundamentals, normal and abnormal patterns. *Neurologic Clinics*, 20(2), 361-396, vi. doi: 10.1016/s0733-8619(01)00005-6.
 166. Punduk, Z., Oral, O., Ozkayin, N., Rahman, K., Varol, R. (2016). Single dose of intra-muscular platelet rich plasma reverses the increase in plasma iron levels in exercise-induced muscle damage: A pilot study. *Journal of Sport and Health Science*, 5(1), 109-114. doi: 10.1016/j.jshs.2014.11.005. Epub 2015 Feb 16.
 167. Qin, Y., Yang, G., Wang, L., Qiao, Y., Pan, G., Yang, H., Bai, J., Cui, W., Geng, D. (2023). An Update on adipose-derived stem Cells for regenerative medicine: Where challenge meets opportunity. *Advanced Science*, 10(20), 2207334. <https://doi.org/10.1002/advs.202207334>
 168. Ranjbar, K., & Fayazi, B. (2019). Vascularisation of skeletal muscle. In: M. T. Valarmathi (Ed.). *Muscle cells - recent advances and future perspectives* (pp. 1-17). IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.85903.
 169. Richards, R.L. (1951). Ischaemic lesions of peripheral nerves: A review. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 14(2), 76-87. doi: 10.1136/jnnp.14.2.76.
 170. Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., Peters, K., Isner, J. (1999). Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *The American Journal of Pathology*, 154(2), 355-363. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65282-0.
 171. Rosova, I., Link, D., & Nolte, J.A. (2010). shRNA-mediated decreases in c-Met levels affect the differentiation potential of human mesenchymal stem cells and reduce their capacity for tissue repair. *Tissue Engineering Part A*, 16(8), 2627-2639. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0363.
 172. Ruijs, A.C., Jaquet, J.B., Kalmijn, S., Giele, H., Hovius, S.E. (2005). Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and

- sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116(2), 484-494; discussion 495-6.
173. Sakuma, M., Gorski, G., Sheu, S.-H., Lee, S., Barrett, L.B., Singh, B., Omura, T., Latremoliere, A., Woolf, C. (2016). Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *European Journal of Neuroscience*, 43(3), 451-462. doi: 10.1111/ejn.13059.
 174. Sallomi, D., Janzen, D.L., Munk, P.L., Connell, D.G., Tirman, P.F. (1998). Muscle denervation patterns in upper limb nerve injuries: MR imaging findings and anatomic basis. *AJR American Journal of Roentgenology*, 171(3), 779-784. doi: 10.2214/ajr.171.3.9725316.
 175. Sanchez, J.E., Conkling, N., & Labropoulos, N. (2011). Compression syndromes of the popliteal neurovascular bundle due to Baker cyst. *Journal of Vascular Surgery*, 54(6), 1821-1829. doi: 10.1016/j.jvs.2011.07.079.
 176. Sassoli, C., Vallone, L., Tani, A., Chellini, F., Nosi, D., Zecchi-Orlandini, S. (2018). Combined use of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) and platelet rich plasma (PRP) stimulates proliferation and differentiation of myoblasts in vitro: new therapeutic perspectives for skeletal muscle repair/regeneration. *Cell and Tissue Research*, 372(3), 549-570. doi: 10.1007/s00441-018-2792-3. Epub 2018 Feb 5.
 177. Schmidt, A.H. (2017). Acute compartment syndrome. *Injury*, 48(1), 22-25.
 178. Scimeca, M., Bonanno, E., Piccirilli, E., Baldi, J., Mauriello, A., Orlandi, A., Tancredi, V., Gasbarra, E., Tarantino, U. (2015). Satellite cells CD44 positive drive muscle regeneration in osteoarthritis patients. *Stem Cells International*, 2015(11), 1-11. doi: 10.1155/2015/469459. Epub 2015 Jun 1.
 179. Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), 777-786. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00066-0.
 180. Setayesh, K., Villarreal, A., Gottschalk, A., Tokish, J.M., Choate, W.S. (2018). Treatment of muscle injuries with platelet-rich plasma: A review of the literature. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 11(4), 635-642. doi: 10.1007/s12178-018-9526-8.
 181. Siemionow, M., & Arslan, E. (2004). Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*, 24(6), 468-475. doi: 10.1002/micr.20060.
 182. Singh, D.P., Barani Lonbani, Z., Woodruff, M.A., Parker, T.J., Steck, R., Peake, J.M. (2017). Effects of topical icing on inflammation, angiogenesis, revascularization, and myofiber regeneration in skeletal muscle following

- contusion injury. *Frontiers in Physiology*, 8, 93. doi: 10.3389/fphys.2017.00093. eCollection 2017.
183. So, P.Y., So, J.Y., Yoon, S.K., Dong, J.K., Byeol, Y.A., Jong, K.K., Young, J., Hye, L., Hwan, P. (2017). The scaffolding protein, Grb2-associated Binder-1, in skeletal muscles and terminal schwann cells regulates postnatal neuromuscular synapse maturation. *Experimental Neurobiology* 26(3), 141-150. doi: 10.5607/en.2017.26.3.141. Epub 2017 Jun 16.
 184. Soares, R.O.S., Losada, D.M., Jordani, M.C., Évora, P., Castro-E-Silva, O. (2019). Ischemia/reperfusion injury revisited: An overview of the latest pharmacological strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5034. doi: 10.3390/ijms20205034.
 185. Sorokin, Yu.N. (2021). Transient ischemic attack and ischemic stroke in the International Classification of Diseases 11th revision. *International Neurological Journal*, 7(109), 50-57. doi: 10.22141/2224-0713.7.109.2019.183013.
 186. Stacy, B.A., Costidis, A.M., & Keene, J.L. (2015). Histologic changes in traumatized skeletal muscle exposed to seawater: a canine cadaver study. *Veterinary Pathology*, 52(1), 170-175. doi: 10.1177/0300985814522820. Epub 2014 Feb 10.
 187. Stevanovic, M., Sharpe, F. (2014). Late management of compartment syndrome. In: Abzug, J., Kozin, S., Zlotolow, D. (eds) *The pediatric upper extremity*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8758-6_65-1
 188. Stilhano, R.S., Denapoli, P.M.A., Gallo, C.C., Samoto, V.Y., Ingham, S.J.M., Abdalla, R.J., Koh, T., Han, S. (2021). Regenerative effect of platelet-rich plasma in the murine ischemic limbs. *Life Sciences*, 284, 119934. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119934.
 189. Sugiura, Y., & Lin, W. (2011). Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Bioscience Reports*, 31(5), 295-302. doi: 10.1042/BSR20100107.
 190. Szydlak, R. (2023). Mesenchymal stem cells in ischemic tissue regeneration. *World Journal of Stem Cells*, 15(2), 16-30. doi: 10.4252/wjsc.v15.i2.16. PMID: 36909782; PMCID: PMC9993139.
 191. Taatjes, D.J., Sobel, B.E., & Budd, R.C. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(1), 33-43. doi: 10.1007/s00418-007-0356-9. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18000678; PMCID: PMC2137940.
 192. Takhtfooladi, H.A., Takhtfooladi, M.A., Karimi, P., Asl, H.A., Mobarakeh, S.Z. (2014). Influence of tramadol on ischemia-reperfusion injury of rats'

- skeletal muscle. *International Journal of Surgery*, 12(9), 963-968. doi: 10.1016/j.ijssu.2014.07.015. Epub 2014 Jul 22.
193. Tatsis, D., Vasalou, V., Kotidis, E., Anestiadou, E., Grivas, I., Cheva, A., Koliakos, G., Venetis, G., Pramateftakis, M.-G., Ouzounidis, N., Angelopoulos, S. (2021). The combined use of platelet-rich plasma and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes healing. A review of experimental models and future perspectives. *Biomolecules*, 11(10), 1403. <https://doi.org/10.3390/biom11101403>
 194. Taylor, E., Hanna, J., & Belcher, J. (2003). Splinting of the hand and wrist. *Current Orthopaedics*, 17(6), 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.cuor.2003.09.001>
 195. Televiak, A.T., Veresiuk, T.O., Selsky, P.R., Volska, A.S., Kurylo, K.I., Nebesna, Z.M., Datsko, T.V., Boymystrk, I. (2018). Dynamic of indices of lipid peroxidation and antioxidant protection in muscular tissue and blood serum of rats with acute ischemia-reperfusion. *Journal of Education, Health and Sport*, 8(10), 245-255. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1476568>.
 196. Temiz, C., YaSar, S., & Kirik, A. (2021). Surgical treatment of peripheral nerve injuries: Better outcomes with intraoperative NAP recordings. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dernegi*, 27, 510-515.
 197. Thirumala, S., & Devireddy, R.V. (2005). A simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(2), 295-300. doi: 10.1115/1.1865213.
 198. Thomas, C.K., Erb, D.E., Grumbles, R.M., Bunge, R.P. (2000). Embryonic cord transplants in peripheral nerve restore skeletal muscle function. *Neurophysiology*, 84(1), 591-595. doi: 10.1152/jn.2000.84.1.591.
 199. Torres-Torrillas, M., Rubio, M., Damia, E., Cuervo, B., Del Romero, A., Peláez, P., Chicharro, D., Miguel, L., Sopena, J. (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cells: A promising tool in the treatment of musculoskeletal diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3105. doi: 10.3390/ijms20123105.
 200. Tran, T.P., Tu, H., Pipinos, I.I., Muelleman, R.L., Albadawi, H., Li, Y.L. (2011). Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 328-334. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.10.037. Epub 2010 Oct 29.
 201. Tremblay, L.N., Feliciano, D.V., & Rozycki, G.S. (2002). Secondary extremity compartment syndrome. *Journal of Trauma*, 53(5), 833-837. doi: 10.1097/00005373-200211000-00005.

202. Tsai, W.C., Yu, T.Y., Chang, G.J., Lin, L.P., Lin, M.S, Pang, J.S. (2018). Platelet-rich plasma releasate promotes regeneration and decreases inflammation and apoptosis of injured skeletal muscle. *American Journal of Sports Medicine*, 46(8), 1980-1986. doi: 10.1177/0363546518771076. Epub 2018 May 17.
203. Tsuchihara, T., Nukada, H., Nakanishi, K., Morishita, R., Amako, M., Arino, H., Nemoto, K., Chiba, K. (2020). Efficacy of nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor (HGF) against ischemic-reperfusion nerve injury in rats. *PLoS One*, 15(8), e0237156. doi: 10.1371/journal.pone.0237156. eCollection 2020.
204. Turner, N.J., & Badylak, S.F. (2012). Regeneration of skeletal muscle. *Cell and Tissue Research*, 347(3), 759-774. doi: 10.1007/s00441-011-1185-7.
205. Ugalde, V., & Rosen, B.S. (2001). Ischemic peripheral neuropathy. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 12(2), 365-380.
206. Van Waes, O.J., Van Lieshout, E.M., Hogendoorn, W., Halm, J.A., Vermeulen, J. (2013). Treatment of penetrating trauma of the extremities: ten years' experience at a Dutch level 1 trauma center. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 21(1), 2. doi: 10.1186/1757-7241-21-2.
207. Vargas-Maya, N.I., Padilla-Vaca, F., Romero-Gonzalez, O., Rosales-Castillo, E., Rangel-Serrano, A., Aria-Negrete, S., Franco, B. (2021). Refinement of the Griess method for measuring nitrite in biological samples. *Journal of Microbiological Methods*, 187, 106260. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106260>
208. Vitali, M, Ometti, M., Pironti, P., Salvato, D., Sandrucci, A., Leone, O., Safini, V. (2022). Clinical and functional evaluation of bone marrow aspirate concentrate vs autologous conditioned serum in the treatment of knee osteoarthritis. *Acta Biomedica*, 93(5), e2022222. doi: 10.23750/abm.v93i5.12845.
209. Volchegorsky, I.A., Nalimov, A.G., Yarovinsky, B.G., Lifshitz, R.I. (1989). Different means of lipid peroxidation products estimation in heptane-isopropanol extracts of blood. *Questions of Medical Chemistry*, 35, 127-131.
210. Wang, E., Inaba, K., Byerly, S., Escamilla, D., Cho, J., Carey, J., Stevanovic, M., Ghiassi, A., Demetriades, D. (2017). Optimal timing for repair of peripheral nerve injuries. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 83(5), 875-881. doi: 10.1097/TA.0000000000001570.

211. Wang, Z. (2023). Assessing tumorigenicity in stem cell-derived therapeutic products: A critical step in safeguarding regenerative medicine. *Bioengineering*, *10*, 857. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070857>
212. Weber, D., Davies, M.J., & Grune, T. (2015). Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biology*, *45*(C), 367-380. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.005. Epub 2015 Jun 18.
213. Wegner, K.A., Keikhosravi, A., Eliceiri, K.W., Vezina, C.M. (2017). Fluorescence of picosirius red multiplexed with immunohistochemistry for the quantitative assessment of collagen in tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *65*(8), 479-490. doi: 10.1369/0022155417718541.
214. Whetzel, T.P., Stevenson, T.R., Sharman, R.B., Carlsen, R.C. (1997). The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *100*(7), 1767-1775. doi: 10.1097/00006534-199712000-00019.
215. Wilbourn, A.J., Furlan, A.J., Hulley, W., Ruschhaupt, W. (1983). Ischemic monomelic neuropathy. *Neurology*, *33*(4), 447-451. doi: 10.1212/wnl.33.4.447.
216. Willsey, D.B., & Peterfreund, R.A. (1997). Compartment syndrome of the upper arm after pressurized infiltration of intravenous fluid. *Journal of Clinical Anesthesia*, *9*(5), 428-430. doi: 10.1016/s0952-8180(97)00073-1.
217. Wu, H., Xiong, W.C., & Mei, L. (2010). To build a synapse: Signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*, *137*(7), 1017-1033. doi: 10.1242/dev.038711.
218. Xie, X., Wang, Y., Zhao, C., Guo, S., Liu, S., Jia, W., Tuan, R.S., Zhang, C. (2012). Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials*, *33*(29), 7008-7018. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.058. Epub 2012 Jul 19.
219. Yaniv, Y., Sivan, R., & Landesberg, A. (2005). Analysis of hysteresis in force length and force calcium relations. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *288*(1), H389-H399. doi: 10.1152/ajpheart.00722.2003.
220. Yassin, M.M., Harkin, D.W., Barros, D'Sa A.A., Halliday, M.I., Rowlands, B.J. (2002). Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World Journal of Surgery*, *26*(1), 115-121. doi: 10.1007/s00268-001-0169-2. Epub 2001 Oct 25.

221. Zachar, L., Bačenková, D., & Rosocha, J. (2016). Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research*, 9, 231-240. doi: 10.2147/JIR.S121994. eCollection 2016.
222. Zamorano, M., Castillo, R.L., Beltran, J.F., Herrera, L., Farias, J.A., Antileo, C. (2021). Tackling ischemic reperfusion injury with the aid of stem cells and tissue engineering. *Frontiers in Physiology*, 12, 705256. doi: 10.3389/fphys.2021.705256. PMID: 34603075; PMCID: PMC8484708.
223. Zhang, H., Wang, X., Guan, M., Li, C., Luo, L. (2013). Skeletal muscle evaluation by MRI in a rabbit model of acute ischemia. *British Journal of Radiology*, 86(1026), 20120042. doi: 10.1259/bjr.20120042.
224. Zhou, T., Prather, E.R., Garrison, D.E., Zuo, L. (2018). Interplay between ROS and antioxidants during ischemia-reperfusion injuries in cardiac and skeletal muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 417. doi: 10.3390/ijms19020417.
225. Zhu, D.C., Lin, J.H., Xu, J.J., Guo, Q., Wang, Y.H., Jiang, C., Lu, H., Wu., Y.-S. (2021). An assessment of morphological and pathological changes in paravertebral muscle degeneration using imaging and histological analysis: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disorders*, 22(1), 854. doi: 10.1186/s12891-021-04734-3. <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04734-3>.

ДОДАТОК А**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Pidlisetskyu, A., Savosko, S., Dolhopolov, O., Makarenko, O. (2021). Peripheral nerve lesions after a mechanically induced limb ischemia. *Georgian Medical News*, Jan(310), 165-169. <https://www.geomednews.com/v310-january-2021.html>.
2. Pidlisetskyu, A., Savosko, S., Gayovich, I., Dolhopolov, O., Biliavskiy, V. (2023). The ultrasonography examination of skeletal muscles in traumatic ischemia (experimental study). *Wiadomosci Lekarskie Medical Advances*, 76(1), 175-181. doi: 10.36740/WLek202301124.
3. Підлісецький, А.Т., Косякова, Г.В., Горідько, Т.М., Бердишев, А.Г., Мегедь, О.Ф., Савосько, С.І., Долгополов, О.В. (2021). Введення збагаченої тромбоцитами плазми або концентрованого клітинного аспірату кісткового мозку після механічноіндукованої ішемії покращує біохімічні показники в скелетних м'язах. *Український Біохімічний Журнал*, 93(3), 30-38. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.030>.
4. Pidlisetskyu, A. T. (2021). Damages of neuromuscular system after mechanical-induced limb ischemia (Experimental Study). *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 2, 58-62.
5. Страфун, С.С., Підлісецький, А.Т., Савосько, С.І., Гайович, І.В., Долгополов, О.В. (2021). Ультрасонографічне дослідження скелетних м'язів в умовах травматичної ішемії (експериментальне дослідження). *Журнал Національної Академії Медичних Наук України*, 27(2), 110-111. <http://journal.amnu.gov.ua/archive-ua/2021-27-2>
6. Pidlisetsky, A., Dolhopolov, O., Savosko, S., & Makarenko, O. (2023). Дослідження структурних змін у субфасціальній ділянці скелетних м'язів гомілки після травматичної ішемії та впливу регенеративних технологій на

відновлювальні процеси (експериментальне дослідження). *Ортопедія, травматологія та протезування*, (4), 63–69. <https://doi.org/10.15674/0030-59872021463-69> <http://otp-journal.com.ua/article/view/251432> (Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).

7. Підлісецький, А.Т., Савосько, С.І., Гайович, І.В., Долгополов, О.В., Білявський, В.О. (2021, 2-4 септєбря). Ультрасонографічне дослідження скелетних м'язів в умовах травматичної ішемії (Експериментальне дослідження). Матеріали п'ятої Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лікування патології суглобів та ендопротезування», Запоріжжя-Приморськ, С.69.

8. Підлісецький, А.Т., Долгополов, О.В., Савосько, С.І., Гайович, І.В., Білявський, В.О. (2021). Вплив клітинних технологій на некротичні зміни ішемізованих м'язів кінцівок (експериментальне дослідження). Науково-практична конференція з міжнародною участю «Регенеративні технології в травматології та ортопедії», Київ, 28.10.2021 - 29.10.2021

9. Pidlisetskyu, A., Dolhopolov, O., Gaiovych, I., Bezruchenko, S., Siforov, D., Biliavskyi, V., Kulyk, Y. (2022, June 22-24). Poster presentation: Volkmann's Contracture. The Influence Of Cell Technology On The Reduction Of Necrosis (Experiment Study), 23rd EFORT Annual Congress held in Lisbon, Portugal.

10. Підлісецький, А.Т., Долгополов, О.В., Савосько, С.І., Макаренко, О.М. (2023). Морфологічні особливості атрофії м'язів кінцівки на моделі травматично-індукованої ішемії. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвячена пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю. Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці» Київ, 8-9 червня (с. 132).

ДОДАТОК Б

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення та результати роботи були обговорені на:

1. Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Регенеративні технології в травматології та ортопедії», м. Київ, Україна, 28-29 жовтня 2021 року, усна доповідь.
2. П'ята Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання лікування патології суглобів та ендопротезування», м. Приморськ, 2-4 вересня, 2021 року, усна доповідь.
3. Міжнародна науково-практична конференція 41ST SICOT ORTHOPAEDIC WORLD CONGRESS (м. Будапешт, Угорщина, 2021 рік),
4. Науково-практична конференція з міжнародною участю «The 23rd EFORT Annual Congress», м. Лісабон, Португалія, 22-24 червня 2022 року, постерна доповідь.
5. Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю. Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці», м. Київ, 8-9 червня 2023 року, усна доповідь.