

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

ЛИСАК АНДРІЙ СЕРГІЙОВИЧ

УДК: [616.833-001-06:616.74-009]:616-018.1-712.4:57.089.6(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
ВПЛИВ АСПРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ НА СКЕЛЕТНИЙ М'ЯЗ В  
ДЕНЕРВАЦІЙНО-РЕІННЕРВАЦІЙНИЙ ПЕРІОД  
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

22 «Охорона здоров'я»

222 – медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD)

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

\_\_\_\_\_ Лисак А.С.

Науковий керівник: Страфун Сергій Семенович, доктор медичних наук, професор,  
чл.-кор. НАМН України

Київ – 2024

## АНОТАЦІЯ

**Лисак А.С. Вплив аспірату кісткового мозку на скелетний м'яз в денерваційно-реіннерваційний період (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 «Національний інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, 2024.

У дисертаційній роботі розкрита проблема впливу аспірату кісткового мозку на скелетний м'яз в денерваційно-реіннерваційний період.

Мета дослідження – дослідити вплив аспірату кісткового мозку на функціональні, структурні та біохімічні зміни в скелетних м'язах тазової кінцівки експериментальних тварин у денерваційно-реіннерваційний період на тлі моделювання травматичного ураження та відновлення сідничного нерву.

В експерименті проводилось дослідження динаміки розвитку структурних та функціональних змін скелетних м'язів на моделі післятравматичної денервації та реіннервації кінцівки а також за умов введення аспірату червоного кісткового мозку. У терміни 8, 12, та 16 тижнів після хірургічного втручання з нейротомії та нейрорафії сідничного нерву оцінювали структурні (за даними клінічної оцінки експериментальних тварин, комп'ютерної та магнітно резонансної томографії, морфологічних та біохімічних методів обстеження) та функціональні (за даними електронеуроміографії) зміни, та порівнювали їх між групами де не виконували введення аспірату червоного кісткового мозку, та групами де введення виконували під час первинного хірургічного втручання, та через 7 тижнів (на початку реіннервації цільових м'язів). Окремими завданнями ми виділили дослідження клінічних проявів денервації кінцівки, та вплив ін'єкції аспірату червоного кісткового мозку в різні терміни його введення на вираженість цих проявів. Також ми дослідили функціональні зміни реіннервації цільових м'язів відповідно до даних електронеуроміографічного дослідження, та визначили зміни, що виникають в скелетних м'язах кінцівок за допомогою методів комп'ютерної та магнітно

резонансної томографії. В основу біохімічних досліджень лягло завдання щодо оцінки стану пероксидації та ферментативної антиоксидантної системи м'язової тканини у денерваційно-реіннерваційному періоді, та визначення ефектів, які може спричинити введення аспірату кісткового мозку. Морфологічне дослідження та визначення змін у відновленому сідничному нерві та в міоцитах скелетних м'язів стало окремими завданнями роботи.

Результати проведеного експериментального дослідження дали змогу встановити особливості впливу аспірату червоного кісткового мозку на динаміку структурних та функціональних змін скелетних м'язів кінцівки після перенесеної денервації та на етапах реіннерваційного процесу. Визначено що введення аспірату кісткового мозку зменшує прояви денерваційних ускладнень (трофічні виразки, ознаки аутофагії сегментів кінцівки) та набряк цільових м'язів в ранньому денерваційному періоді. Зареєстровано більшу кількість потенціалів рухових одиниць в групах тварин де виконували введення аспірату кісткового мозку. Крім того визначено що введення аспірату сприяє проростанню більшої кількості аксонів через зону шва нерву в ранньому періоді, зменшує прояви гіпотрофії та дегенерації міоцитів, знижує рівні продуктів пероксидації ліпідів та підвищує рівень каталазної активності. Показано основні клінічні прояви денервації кінцівки такі як трофічні виразки, ознаки аутофагії сегментів кінцівки, переломи кісток гомілки та їх незрошення. В ході експериментального дослідження продемонстровано, що введення аспірату червоного кісткового мозку зменшує прояви денервації кінцівки, набряк скелетних м'язів та вираженість проявів гіпотрофії.

За допомогою нейрофізіологічних методів, голкової електронейроміографії, продемонстровано характер перебігу денерваційно-реіннерваційного процесу в скелетних м'язах, та вплив введення аспірату кісткового мозку на цей процес. Виявлено що віддалене введення аспірату кісткового мозку (в умовах експерименту це термін 7 тижнів) – сприяє покращенню реіннервації, що проявлялось у вигляді реєстрації більшої кількості потенціалів рухових одиниць. Проте параметри потенціалів рухових одиниць як при введенні аспірату кісткового мозку так і без –

залишались співставними та співвідносились з відповідними стадіями денерваційно-реіннерваційного процесу.

При аналізі даних отриманих рентгенологічними методами такими як комп'ютерна та магнітно-резонансна томографія визначено що введення аспірату кісткового мозку зменшує прояви набряку м'язової тканини, що опосередковано може свідчити про позитивний вплив на сповільнення прогресії гіпотрофії цільових м'язів при їх денервації.

Вивчені морфологічні зміни в сідничному нерві після його перетину та нейрорафії, та вплив на регенерацію нерву введення аспірату червоного кісткового мозку в цільові м'язи. Проростання аксонів в дистальний сегмент нерву виявлено у всіх випадках, проте, отримані дані вказують, що введення аспірату кісткового мозку сприяло покращенню динаміки регенерації аксонів, та позитивно впливало на реіннервацію скелетного м'яза. Цікавим спостереженням є те, що введення аспірату кісткового мозку покращувало щільність проростання нервових волокон через зону шва на ранньому етапі, проте вже у другий термін експериментального дослідження (12 тижнів) різниці між групами, яким вводився аспірат кісткового мозку виявлено не було. Також виявлено більшу щільність проростання аксонів периферичного нерву у м'яз, що демонструє кращу реіннервацію під дією аспірату кісткового мозку. Наведені дані можна розглядати як морфологічний субстрат, що відображений голковою електронейроміографією.

Також одержані в ході експерименту морфологічні та ультраструктурні дані дали можливість сформулювати гіпотезу виникнення у денервованих м'язах стану рівноваги між процесами регенерації та гіпотрофії м'язової тканини. Проявом цього стану є одночасне зменшення діаметру та деструкція одних м'язових волокон та гіпертрофія інших. Відмічено що введення аспірату червоного кісткового мозку дозволяє пролонгувати період рівноваги між процесами дегенерації та регенерації у денервованому скелетному м'язі шляхом уповільнення деструкції м'язових волокон, тим самим покращити перспективи реіннерваційного процесу.

Вивчено динаміку змін ферментативної та антиоксидантної систем скелетного м'яза після перетину та відновлення сідничного нерву, а також вплив аспірату червоного кісткового мозку на ці системи. Так визначено, що продукти пероксидації ліпідів проградієнтно зростали у всі терміни, проте введення клітин червоного кісткового мозку дозволило зменшити їх рівень, як шляхом покращення їх утилізації, так і пригнічення їх синтезу. Крім того зареєстровано зростання активності каталази, як прояв активації антиоксидантної системи. Виявлено що введення аспірату червоного кісткового мозку позитивно впливає на біохімічні захисні механізми при денерваційному ураженні скелетних м'язів.

Таким чином у роботі проведено аналіз динаміки розвитку гіпотрофічних змін у скелетних м'язах після денервації та на етапах реіннерваційного процесу під впливом аспірату червоного кісткового мозку. Досліджено як загальні клінічні прояви денервації кінцівки, так і морфо-функціональні зміни (за допомогою таких методів, як голкова електронейроміографія, комп'ютерна та магнітно резонансна томографії, гістологічні та ультраструктурні зміни, а також динаміка змін перекисно-відновного стану) цільових м'язів тазових кінцівок дослідних тварин, а також визначено, який вплив має введення аспірату кісткового мозку на зазначені вище показники. Експериментальне вивчення функціональних, рентгенологічних, морфологічних та біохімічних змін у скелетних м'язах гомілки дозволило виявити певний позитивний вплив від введення аспірату червоного кісткового мозку, а саме: зменшення прояву набряку скелетних м'язів, збільшення кількості потенціалів рухових одиниць, зменшення проявів некроптозу та дегенерації міоцитів, зменшення кількості продуктів пероксидації ліпідів та зростання активності антиоксидантних систем.

**Ключові слова:** травма, сідничний нерв, скелетні м'язи, денерваційно-реіннерваційний період, епідеміологія, клініка, УЗД, ЕНМГ, МРТ, КТ, біохімічні зміни, морфологія, морфометрія, електронна мікроскопія, кістковий мозок, мезенхімальні стовбурові клітини, стовбурові клітини, регенеративна медицина,

клітинна терапія, репаративний потенціал кісткового мозку, репаративна регенерація.

## ABSTRACT

**Lysak A.S. The effect of bone marrow aspirate on skeletal muscle during the denervation-reinnervation period (experimental study). – Qualification scientific work in the form of a manuscript.**

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

The dissertation work on the problem of the influence of bone marrow aspirate on skeletal muscle during the denervation-reinnervation period.

The purpose of the study was to investigate the influence of bone marrow aspirate on functional, structural and biochemical changes in the skeletal muscles of the pelvic limb of experimental animals during the denervation-reinnervation period after modeling traumatic injury and restoration of the sciatic nerve.

The experiment investigated the dynamics of the development of structural and functional changes in skeletal muscles in the model of post-traumatic denervation and reinnervation of the limb, as well as under the conditions of the injection of red bone marrow cell aspirate. At 8, 12, and 16 weeks after surgical intervention for sciatic nerve neurotomy and neurorrhaphy, structural (according to clinical assessment, computed and magnetic resonance tomography, morphological and biochemical examination methods) and functional (according to electroneuromyography) changes were evaluated, and they were compared between groups where red bone marrow aspirate was not injected, and groups where the injection was performed simultaneously with the primary surgical intervention, and after 7 weeks (at the beginning of reinnervation of the target muscles). As separate tasks, we identified the study of clinical manifestations of limb denervation, and the effect of red bone marrow aspirate injection at different times of its administration

on the severity of these manifestations. We also investigated the functional changes in the reinnervation of target muscles according to the data of electroneuromyographic research, and determined the radiological changes that occur in the skeletal muscles of the limbs using the methods of computer and magnetic resonance tomography. The basis of biochemical studies was the task of assessing the state of peroxidation and enzymatic antioxidant system of muscle tissue in the denervation-reinnervation period, and determining the effects that can be caused by the introduction of bone marrow aspirate. Morphological research and determination of changes in the restored sciatic nerve and in skeletal muscle myocytes became separate tasks of the work.

The results of the experimental study made it possible to establish the features of the influence of red bone marrow aspirate on the dynamics of structural and functional changes in skeletal muscles of the limb after denervation and at the stages of the reinnervation process. It was determined that the injection of bone marrow aspirate reduces the manifestations of denervation complications (trophic ulcers, signs of autophagy of limb segments) and edema of target muscles in the early denervation period. A greater number of motor unit potentials were registered in groups of animals where bone marrow aspirate was administered. In addition, it was determined that the introduction of aspirate promotes the regeneration of a greater number of axons through the nerve suture zone in the early period, reduces the manifestations of hypotrophy and degeneration of myocytes, reduces the levels of lipid peroxidation products and increases the level of catalase activity. The main clinical manifestations of limb denervation such as trophic ulcers, signs of autophagy of limb segments, fractures of the tibia bones and their nonunion are shown. An experimental study demonstrated that the administration of red bone marrow aspirate reduces the manifestations of limb denervation, skeletal muscle edema, and the severity of hypotrophy.

Using neurophysiological methods, needle electroneuromyography, the nature of the course of the denervation-reinnervation process in skeletal muscles and the effect of the injection of bone marrow aspirate on these processes were studied. It was found that the late injection of bone marrow aspirate (in the experiment this is a period of 7 weeks)

– contributes to the improvement of reinnervation, which was manifested in the form of registration of a larger number of motor unit potentials. However, the parameters of motor unit potentials both with and without the injection of bone marrow aspirate - remained comparable and correlated with the corresponding stages of the denervation-reinnervation process.

When analyzing the data obtained by X-ray methods such as computer and magnetic resonance tomography, it was determined that the injection of bone marrow aspirate reduces the manifestations of muscle tissue edema, which may indirectly indicate a positive effect on slowing the progression of hypotrophy of target muscles during their denervation.

When studying the morphological changes in the sciatic nerve after its section and neurorrhaphy, and the effect on them of the injection of red bone marrow aspirate into the target muscles – the regeneration of axons into the distal segment of the nerve was detected in all cases. However, the data obtained indicate that the injection of bone marrow aspirate contributed to the improvement of the dynamics of axon regeneration and had a positive effect on skeletal muscle reinnervation. An interesting observation is that early injection of bone marrow aspirate improved the density of nerve fiber sprouting through the suture zone at an early stage, but already in the second term of the experimental study (12 weeks) no difference was found between the groups that received bone marrow aspirate. A higher frequency of peripheral nerve sprouting into the muscle was also found, which demonstrates better reinnervation under the influence of bone marrow aspirate, and is a morphological substrate of the data obtained using needle electroneuromyography.

Also, the morphological and ultrastructural data obtained during the experiment made it possible to formulate the hypothesis of the emergence of a state of equilibrium in denervated muscles between the processes of regeneration and hypotrophy of muscle tissue, the intersection of which will lead to atrophy of the target muscle. The manifestation of this condition is a simultaneous decrease in diameter and destruction of some muscle fibers and hypertrophy of others. It was noted that the injection of red bone



marrow aspirate allows to prolong this period, thereby extending the period until reinnervation.

The dynamics of changes in the enzymatic and antioxidant systems of skeletal muscle after sectioning and restoration of the sciatic nerve, as well as the effect of red bone marrow aspirate on these systems, were demonstrated. Having analyzed the change in enzyme activity upon muscle denervation and the injection of bone marrow aspirate, it was determined that lipid peroxidation products increased progressively at all times, however, the injection of red bone marrow cells allowed to reduce their level, both by improving of their utilization and inhibiting their synthesis. In addition, an increase in catalase activity was registered as a manifestation of the activation of the antioxidant system. It was found that the injection of red bone marrow aspirate has a positive effect on biochemical protective mechanisms in denervated skeletal muscles.

Thus, the work analyzed the dynamics of the development of hypotrophic changes in skeletal muscles after denervation and at the stages of the reinnervation process under the influence of red bone marrow aspirate cells. Both the general clinical manifestations of limb denervation and morpho-functional changes (using such methods as needle electroneuromyography, computer and magnetic resonance tomography, histological and ultrastructural changes, as well as the dynamics of changes in the peroxide-reduction state) of the target muscles of the pelvic limbs of experimental animals were studied, and the effect of the injection of bone marrow aspirate on the above-mentioned indicators was also determined. Experimental study of functional, radiological, morphological and biochemical changes in the skeletal muscles of the lower leg allowed us to identify a certain positive effect of the injection of red bone marrow aspirate.

**Keywords:** trauma, sciatic nerve, skeletal muscles, denervation-reinnervation period, epidemiology, clinical findings, ultrasound, EMG, MRI, CT, biochemical changes, morphology, morphometry, electron microscopy, bone marrow, mesenchymal stem cells, stem cells, regenerative medicine, cell therapy, reparative potential of bone marrow, reparative regeneration.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

***Стаття у періодичному виданні, включеному до наукометричної бази Scopus:***

1. Lysak, A., Savosko, S., Strafun, S., Utko, N., Makarenko, O. (2022). Effect of bone marrow aspirate in denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Wiadomości Lekarskie Medical Advances*, 75(3), 634-640. doi: 10.36740/WLek202203112. *(Здобувач особисто брав участь у виконанні всіх експериментальних досліджень, що ввійшли до матеріалу статті. Здійснив аналіз ефективності застосування аспірату кісткового мозку при денерваційно-реінерваційному процесі в скелетних м'язах та підготував публікацію до друку).*

***Стаття у періодичному виданні іншої держави, яка є повноцінним членом-учасником Європейського союзу:***

2. Strafun, S., Gaiko, O., Halii, Y., Lysak, A. (2020). Study of bone marrow aspirate injection effect on denervated muscle according to electromyography studies. *EUREKA: Health Sciences*, (6), 24-30. doi: 10.21303/2504-5679.2020.001499. *(Здобувач особисто брав участь у виконанні всіх експериментальних досліджень, що ввійшли до матеріалу статті. Допомігав у проведенні електронейроміографічного дослідження. Здійснив аналіз отриманих даних та підготував публікацію до друку).*

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

3. Лисак, А.С., (2019). Вплив пунктату кісткового мозку на відновлення пошкодженого сідничого нерва (експериментальне дослідження). *Morphologia*, 13(3), 66-69. doi: 10.26641/1997-9665.2019.3.66-69. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

4. Страфун, С.С., Лисак, А.С., Третьяков, Р.А. (2021). Вивчення впливу аспірату кісткового мозку на денервованій м'яз за даними КТ та МРТ досліджень. *Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування*, 111(4), 28-35. doi: 10.37647/0132-

2486-2021-111-4-28-35. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, допомагав у проведенні КТ та МРТ досліджень, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

5. Страфун, С.С., Лисак, А.С., Гузоватий, О.Ю. (2022). Вивчення в експерименті впливу введення аспірату кісткового мозку в денервований м'яз (клінічні прояви денервації кінцівки). Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування, 113(2), 4-10. doi: 10.37647/0132-2486-2022-113-2-4-10. *(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):***

6. Lysak, A., (2019) The effect of bone marrow puncture on the sciatic nerve injury repair (experimetal study). Матеріали третьої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, С.68-69. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

7. Страфун, С.С., Гайко, О.Г., Третяков, Р.А., Галій, Ю.І., Макаренко, О.М., Савосько, С.І., Лисак, А.С. (2019). Вплив стромальних стовбурових клітин на денерваційно-реіннерваційні процеси в скелетних м'язах. Збірник наукових праць "XVIII з'їзд ортопедів-травматологів України", Івано-Франківськ, С.179. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

8. Lysak, A., Strafun, S., Gaiovych, V., Gaiovych, I. (2020). Regenerative technologies in brachial plexus surgery. FESSH 2020 abstract book. Базель, Швейцарія, С.36. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

9. Страфун, С.С., Гайович, В.В., Гайович, І.В., Лисак, А.С. (2020). Використання регенеративних технологій в хірургії плечового сплетення. Збірник

наукових праць: "Нейроортопедія: актуальні питання сьогодення та перспективи розвитку", Львів. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

10. Страфун, С.С., Гайович, В.В., Гайович, І.В., Лисак, А.С. (2021). Використання регенеративних технологій в лікуванні пацієнтів з травматичними ураженнями плечового сплетення. Збірник матеріалів конференції "Регенеративні технології в травматології та ортопедії", Київ. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

11. Гайко, О.Г., Галій, Ю.І., Третьяков, Р.А., Лисак, А.С. (2021). Вплив стромальних стовбурових клітин червоного кісткового мозку на скелетний м'яз в денерваційно-реіннерваційному періоді. Збірник матеріалів конференції "Регенеративні технології в травматології та ортопедії", Київ. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

12. Lysak, A., Strafun, S., Bezuhlyi, A., Gaiovych V. (2022). Comprehensive approach in the treatment of patients with traumatic brachial plexus lesions. IFSSH, IFSHT & FESSH Combined Congress London 2022. The Journal of Hand Surgery - European Volume. 47E(1), C.172. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

13. Lysak, A., Strafun, S., Halii, Y., Tretyakov, R. (2022). Effect of bone marrow aspirate cells in denervation-induced skeletal muscle atrophy. IFSSH, IFSHT & FESSH Combined Congress London 2022. The Journal of Hand Surgery - European Volume. 47E(1), C.174. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

14. Лисак, А.С., Кирпичова, А.Ю., Страфун, С.С. (2023). Дослідження змін ультраструктури скелетних м'язів гомілки кроля після перетину сідничного нерву

та введення аспірату кісткового мозку. Збірник матеріалів всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю. Б. Чайковського «ТКАНИННІ РЕАКЦІЇ В НОРМІ, ЕКСПЕРИМЕНТІ ТА КЛІНІЦІ», Київ. *(Здобувач розробив дизайн дослідження, зібрав матеріал та провів його статистичну обробку і аналіз, написав та підготував публікацію до друку).*

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ .....	1
ЗМІСТ .....	13
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1 – ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
РОЗДІЛ 2 – МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ .....	46
2.1 Методика проведення експерименту.....	46
2.2. Визначення клінічних проявів денервації кінцівки.....	54
2.3. Електронеуроміографічне дослідження .....	56
2.4. Рентгенологічне дослідження за даними комп'ютерної томографії.....	58
2.5. Дослідження за даними магнітно-резонансної томографії.....	60
2.6. Методика гістологічного дослідження.....	61
2.7. Методика електронної мікроскопії.....	62
2.8. Методика морфометричного дослідження .....	63
2.9. Біохімічне дослідження.....	64
РОЗДІЛ 3 – КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ДЕНЕРВАЦІЇ КІНЦІВКИ .....	70
3.1. Наукове підґрунтя до експериментального вивчення впливу аспірату кісткового мозку на скелетний м'яз .....	70
3.2. Дослідження клінічних проявів денервації кінцівки тварин на різних етапах денерваційно-реіннерваційного процесу.....	74
РОЗДІЛ 4 – ЕЛЕКТРОНЕЙРОМІОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	81
РОЗДІЛ 5 – КТ ТА МРТ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦІЛЬОВИХ М'ЯЗІВ.....	91

5.1. Дослідження змін у цільових м'язах методом КТ .....	92
5.2. Дослідження змін у цільових м'язах методом МРТ .....	97
РОЗДІЛ 6 – ГІСТОЛОГІЧНА ТА МОРФОМЕТРИЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ СІДНИЧНОГО НЕРВУ ПІСЛЯ ПОВНОГО ПЕРЕТИНУ ТА НЕЙРОРАФІЇ .....	108
6.1. Загальна морфологічна картина регенерації сідничного нерву .....	108
6.2. Вплив аспірату кісткового мозку на регенерацію нерву .....	113
6.3. Докази реіннервації скелетних м'язів після нейрорафії та введення аспірату кісткового мозку .....	114
РОЗДІЛ 7 – СТРУКТУРНІ ЗМІНИ М'ЯЗІВ ГОМІЛКИ ПІСЛЯ ПОВНОГО ПЕРЕТИНУ ТА НЕЙРОРАФІЇ .....	117
7.1. Зміни сполучної тканини у денервованих м'язах .....	119
7.2. Кількісна оцінка атрофії м'язів .....	121
7.3. Ультраструктурні зміни міоцитів м'язів гомілки .....	125
РОЗДІЛ 8 – РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ БІОХІМІЧНИХ ЗМІН У СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ ПІСЛЯ ДЕНЕРВАЦІЇ ТА ПЛАСТИКИ НЕРВУ .....	132
ВИСНОВКИ .....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	140

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

nAChR	-	Нікотин-Ацетилхолінові рецептори
VEGF	-	Фактор росту ендотелію судин
IGF-1	-	Інсуліноподібний фактор росту-1
GH	-	Гормон росту
MuSK	-	М'язово-специфічна тирозинкіназа
NGF	-	Фактор росту нервів
IL-4	-	Інтерлейкін 4
GHR	-	Грелін
FES	-	Функціональна електростимуляція
ЕНМГ	-	Електронеуроміографія
РО	-	Рухова одиниця
ПРО	-	Потенціал рухових одиниць
КТ	-	Комп'ютерна томографія
МРТ	-	Магнітно резонансна томографія
HU	-	Одиниці шкали Хаунсфілда
УОС	-	Умовні одиниці сірого
Об.	-	Об'єктив
Ок.	-	Окуляр
ТБК	-	Тіобарбітурова кислота
ГП	-	Глутатіонпероксидаза
ГР	-	Глутатіонредуктаза
СОД	-	Супероксиддисмутаза



## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження:** Ушкодження периферичного нерву – важка травма що супроводжується втратою рухової функції, чутливості, або, зазвичай, обох цих функцій (Sunderland; Mackinnon).

Травми периферичних нервів кінцівок займають важливе місце у структурі загального травматизму – від 1,3-2,8% (Castillo-Galván ML) до 1,5-3,5% серед усіх травм населення (Вишневський). За даними реєстру травм населення Канади ушкодження нервових стовбурів складає 2-3%, в той час як 2% травм (згідно даних реєстру травм Австралії) є ураженнями периферичних нервів кінцівок (Noble et al.). За даними Swedish Hospital Discharge Register (Шведський реєстр виписок з лікарні) за 1998-2006 роки травма периферичних нервів зустрічалась з частотою 13,9 на 100000 пацієнтів-рік, при цьому травма плечового сплетення була визначена як найбільш важка, складаючи в середньому 68 пацієнтів та 960 ліжко-днів на рік (Asplund et al.). В Сполучених Штатах Америки щорічно виконується близько 50000 оперативних втручань на периферичних нервах, загальна вартість яких більше 7 мільярдів доларів США (Castillo-Galván ML). Серед цих уражень переважають травми нервів верхньої кінцівки, що складають 77% серед всіх травматичних уражень периферичних нервів. Lad S.P. та співавтори, посилаючись на US National Inpatient Sample database (Національна база даних пацієнтів що перебувають на стаціонарному лікуванні в США), зазначають що ушкодження серединного, ліктьового та променевого нервів зустрічається частіше ніж ушкодження плечового сплетення (Lad et al.). Ураження периферичних нервів, а тим більше сплетень, це надзвичайно важкі, виснажливі травми що нерідко призводять до інвалідизації пацієнтів (28-77% травмованих стає інвалідами). Інвалідами I-II груп стають близько 15,5% постраждалих (Вишневський). Серед медико-соціальних чинників що суттєво впливають на інвалідизацію пацієнтів з травмами периферичних нервів виділено кілька основних факторів: виражений і постійний больовий синдром, підвищена чутливість до холоду, час що минув після

травми, характер роботи пацієнта, старший вік, і особливо травма плечового сплетення (Novak et al.).

«Золотим стандартом» відновлення нервів після їх пошкодження, незважаючи на доволі стрімкий розвиток мікрохірургічних технологій і хірургії периферичних нервів в цілому, залишається їх шов, та аутонейропластика (Birch). Підсумовуючи свій 40-річний досвід роботи Mackinnon S. E. та Dellon A. L. показали, що задовільні результати реіннервації (можливість виконання реіннервованим м'язом роботи проти опору, та відновлення дискримінаційної чутливості, тобто M4S3+ за шкалою MRC Muscle Scale (O'Brien)) при виконанні мікрохірургічного відновлення нерву вдалось досягнути лише у 20-40% пацієнтів (Mackinnon and Dellon). Ovais H. та співавтори наводять віддалені результати (27 місяців після оперативного втручання) 75 випадків ранніх (оперативне втручання виконувалось в день травми) мікрохірургічних відновлень периферичних нервів – відмінні результати (M5S3+) вдалось досягти у 50% пацієнтів, добрі (M4S3) – 37,5%, задовільні (M3S2+) – 12,5% (Habib et al.). Daoutis N. K. зі співавторами аналізуючи віддалені результати (26 місяців після оперативного втручання) аутонейропластики серединного нерву на рівні зап'ястку наводять наступні дані щодо функціонального відновлення цільових м'язів: M4 – 51%, M3 – 17%, M2 – 31,9%, а у випадку оперативного втручання на ліктьовому нерві: M4 – 70,7%, M3 – 14,6%, M2 -14,6% (Daoutis et al.). Проведений Ruijs A. C. у 2005 році метааналіз літературних даних, показав що задовільних результатів функціонального відновлення (поновлення сили м'язів саме до M4-M5) при мікрохірургічному відновленні нерву – вдалось досягти лише у 51,6% пацієнтів (Ruijs et al., “Median and Ulnar Nerve Injuries: A Meta-Analysis of Predictors of Motor and Sensory Recovery after Modern Microsurgical Nerve Repair”).

В чому ж полягає причина значної кількості незадовільних результатів, що отримана в різних дослідженнях фахівців?

Розглядаючи «периферичний нерв – м'яз ефектор» як єдину систему, можна визначити кілька невирішених питань в разі нейротмезису. При травмі без дефекту

нерву слід надавати головну увагу питанням проростання зони шва нерву, проростання аксонів у дистальному фрагменті нерву, відновлення нервово-м'язових синапсів, та денервованого м'яза. У разі ж утворення, або наявності дефекту нерву виникають додаткові чинники – наявність нервового трансплантату, та дистального шва нерву.

Аналізуючи кількість опублікованих статей на сайті pubmed.gov (у 2018 році), що присвячені вивченню кожного з наведених вище питань відновлення периферичних нервів, спостерігається цікава статистика. Переважна більшість публікацій (близько 17017) присвячена проблемі відновлення зони анатомічного ушкодження, друге місце посідають статті з вивчення змін, що відбуваються у денервованому м'язі (біля 4668), в той час як проблемі відновлення нервово-м'язових синапсів (лише 957) приділяється невинновдано мало уваги. Хоча на якість реіннервації м'язів впливають всі ланки системи.

Вивчення процесів що протікають у денервованих м'язах кардинально змінило концепцію розуміння причин незадовільних результатів відновлення рухових периферичних нервів. Раніше вважалось що причиною неефективної реіннервації є розвиток денерваційних змін в скелетних м'язах (виражена гіпотрофія, та початок фіброзно-жирового переродження м'яза) (Gutmann and Zelena; Bass et al.). Дослідження ж останніх років вказують на те, що в процесі прогресування денерваційних змін у м'язах виділяють декілька періодів «плато», тобто рівноваги між процесами дегенерації та регенерації м'язового волокна (Birch; Мак-Комас; Keynes et al.; Bruce M. Carlson). Ряд дослідників вказують, що в цих умовах м'яз зберігає високу потенційну здатність до ефективного відновлення протягом 12-18 місяців, в фаховій літературі зустрічаються дані й про інші терміни – 26 місяців, і навіть 4 роки від моменту розвитку денервації (Grinsell and Keating; Lee and Wolfe; E. Wang et al.).

Сучасна концепція біологічних засад регенерації периферичного нерву та відновлення нервово-м'язових синапсів відводить шваннівським, термінальним шваннівським клітинам ушкоджених периферичних нервів та сателітним клітинам

міоцитів – ключову роль (Grinsell and Keating; Lee and Wolfe; M.F et al.; Birch; Jonsson et al.; Balice-Gordon; W. Liu et al.; Corfas et al.). В той же час провідними причинами незадовільних результатів відновлення периферійних нервів – виділяють проблему денерваційних змін шваннівських клітин дистальних відділів ураженого нервового волокна, загибель чи міграцію термінальних шваннівських клітин ушкоджених нейро-м'язових синапсів, та виснаження пулу сателітних клітин міоцитів (Jonsson et al.; Wu et al.; Balice-Gordon; Sugiura and Lin; W. Liu et al.; Sakuma et al.).

Саме тому важливою проблемою у регенерації периферичних нервів, на нашу думку, є відновлення альтерованих нервово-м'язових синапсів, та покращення регенеративного потенціалу денервованого скелетного м'язу. На цей час класичним методом стимуляції відновлення скелетного м'язу вважається використання електронеїростимуляції (Willand; Gordon and English). Проте в останні часи лікувальна процедура електростимуляції нервів та м'язів зіткнулась з різкою полярністю думок, адже з'явилися дані, що електростимуляція м'язів на етапі їх реіннервації – механічно руйнує мостики термінальних шваннівських клітин до сусідніх кластерів нікотин-ацетилхолінових рецепторів, тим самим перешкоджаючи процесу термінального колатерального спраутингу, а отже і погіршуючи результати реіннервації (Love et al.). Ці дослідження викликали необхідність пошуку альтернативних способів покращення результатів реіннервації.

Певні сподівання на можливість стимуляції відновлення нервово-м'язових синапсів та покращення регенеративного потенціалу денервованого скелетного м'язу покладають клітинні технології: використання факторів росту чи біоактивних речовин (S. Y. Park et al.; Kingham and Terenghi; Marques et al.; Grinsell and Keating) та стовбурових клітин (Thomas et al.; Kingham and Terenghi; Grinsell and Keating; Hogendoorn et al.), адже можливість їх перетворення на шваннівські клітини та сателітні клітини міоцитів – доведена рядом експериментальних робіт (BRAGA-SILVA et al.; Cuevas et al.; Goel et al.; Kumar et al.).

Робочою гіпотезою нашого дисертаційного дослідження стала можливість відновлення пулу термінальних шваннівських клітин та сателітних клітин міоцитів із стромальних стовбурових клітин червоного кісткового мозку, що може позитивно вплинути на реіннервацію нервово-м'язових синапсів, можливість термінального колатерального спраутингу аксонів та покращення регенеративного потенціалу денервованого скелетного м'язу. Таким чином можуть бути створені передумови для формування більших за розмірами рухових одиниць. Адже на цей час – чітка відповідь на питання впливу стромальних стовбурових клітин на скелетний м'яз в денерваційно-реіннерваційний період – відсутня, а більшість існуючих на сьогодні досліджень є дороговартісними, та складними для використання в повсякденній клінічній практиці.

Єдиним об'єктивним методом визначення ефективності реіннервації денервованого м'язу на ранніх етапах відновлення – є електронейроміографія (Robinson; Гайко), проте слід визнати що досі не розроблено жодних доступних та ефективних механізмів і технологій впливу на цей процес.

Саме тому виникла необхідність дослідження впливу стромальних стовбурових клітин на ефективність реіннервації скелетних м'язів, та можливості регулювати цей ендогенний процес.

Сучасна концепція перебігу денерваційно-реіннерваційних змін у скелетному м'язі, а також огляд існуючих на сьогодні технологій та методів впливу на цей процес буде розглянуто в наступному розділі.

**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-реіннерваційні процеси у м'язах (експериментально-клінічне дослідження)» № держреєстрації 0122U000306.

**Мета дослідження:** дослідити вплив аспірату кісткового мозку на функціональні, структурні та біохімічні зміни в скелетних м'язах тазової кінцівки

дослідних тварин у денерваційно-реінерваційний період на тлі моделювання травматичного ураження та відновлення сідничного нерву.

### **Завдання:**

1. В експерименті дослідити розвиток функціональних, структурних та біохімічних змін в м'язовій тканині у денерваційно-реінерваційний період на тлі моделювання травматичного ураження та відновлення сідничного нерву в терміни 8, 12 та 16 тижнів, та визначити вплив клітин аспірату кісткового мозку на ці зміни.
2. Дослідити вплив ін'єкції аспірату клітин кісткового мозку в цільові м'язи на регенерацію хірургічно відновленого периферичного нерву.
3. Оцінити клінічні прояви денервації кінцівки, та вплив введення аспірату кісткового мозку на їх вираженість.
4. Визначити нейрофізіологічні зміни денерваційно-реіннерваційного періоду скелетного м'язу та особливості його реіннервації при введенні аспірату кісткового мозку за допомогою електронейроміографічного дослідження.
5. Оцінити зміни рентгенологічної щільності м'язової тканини (розвиток сполучної тканини) та змін МР-сигналу скелетних м'язів (набряк, гіпотрофія та фіброзно-жирове заміщення м'язу) за допомогою комп'ютерної та магнітно-резонансної томографії.
6. На основі морфологічних досліджень та електронної мікроскопії дослідити структурні зміни скелетних м'язів кінцівки на тлі денерваційно-реіннерваційного процесу та під впливом аспірату кісткового мозку.
7. На основі біохімічних досліджень оцінити стан пероксидації та ферментативної антиоксидантної системи м'язової тканини у денерваційно-реіннерваційному періоді після введення аспірату кісткового мозку.

**Об'єкт дослідження:** скелетний м'яз на етапах денерваційно-реіннерваційного процесу.

**Предмет дослідження:** дані перебігу репаративно-відновних процесів в скелетному м'язі отримані шляхом клінічного, електронейроміографічного,

гістологічного, біохімічного методів, комп'ютерної та магнітно-резонансної томографії, і електронної мікроскопії.

**Методи дослідження:** клінічний (визначення клінічних проявів денервації кінцівки у експериментальних тварин: гіпотрофія кінцівки, наявність трофічних виразок та ознак аутофагії частин кінцівки), променевий (визначення об'єму м'язів і їх рентгенологічної щільності, наявність переломів та незрощень кісток ураженої кінцівки за даними комп'ютерної томографії, та набряку, гіпотрофії чи фіброзно-жирового заміщення м'язової тканини за допомогою магнітно-резонансної томографії при його денервації та під час реіннерваційного процесу), нейрофізіологічний (визначення змін під час реіннервації скелетного м'яза шляхом голкової електронеуроміографії м'язів гомілки кріля зі стимуляцією активних рухів у м'язах тазових кінцівок шляхом зовнішнього механічного подразнення), морфометричний (визначення кількості аксонів що регенерували через зону шва, визначення ступеню гіпотрофії м'язів, кількості м'язових волокон, змін діаметру м'язових волокон та розподілу м'язових волокон за різницею діаметрів), електронна мікроскопія (наявність утворення ламелярних тілець, зміни скоротливих міофібрил, ультраструктурні зміни мітохондрій скелетних м'язів, кількість та щільність розподілу нервових волокон в скелетному м'язі що опосередковано може характеризувати процеси спраутингу аксона), біохімічне дослідження (визначення активності ферментативних систем (енергообмін) м'язу на етапах денерваційно-реіннерваційного процесу).

### **Наукова новизна роботи:**

Вперше отримано наукові дані щодо впливу аспірату кісткового мозку на регенеративний потенціал скелетних м'язів в денерваційно-реіннерваційний період. Виявлено що введення аспірату кісткового мозку сприяє зменшенню клінічних проявів денервації кінцівки (спостерігається менша кількість ускладнень та їх легший перебіг – 14 балів ускладнень в 1 групі, в той час як 6 балів у другій, та 8 балів у третій), реєструється більша кількість потенціалів рухових одиниць шляхом голкової електронеуроміографії. Окрім того нормалізує біохімічні

показники продуктів пероксидації ліпідів (показники метаболічних змін у скелетному м'язі що зростають при їх пошкодженні, реєструються достовірно ( $p < 0,05$ ) менші рівні продуктів пероксидації ліпідів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою у 2 та 3 групах в порівнянні з першою) та підвищує активність каталази (активація антиоксидантної захисної системи), а також сприяє більш тривалому перебігу періоду рівноваги між гіпотрофією та регенерацією що проявлялось у зменшенні проявів гіпотрофії та деструкції міоцитів і реєстрації більшої кількості гіпертрофованих м'язових волокон.

Поглиблено знання щодо якісних та кількісних характеристик структурних змін м'язової тканини у денерваційно-реіннерваційному періоді під впливом клітин аспірату кісткового мозку за допомогою комп'ютерної та магнітно-резонансної томографії. Продемонстровано що відстрочене введення аспірату червоного кісткового мозку достовірно ( $p < 0,05$ ) зменшує набряк денервованих цільових м'язів кінцівки за даними КТ та МРТ. Відмічали більший загальний рівень вираженості МР-сигналу з м'язів в режимі T2 в першій групі (медіана – 197,26%), у порівнянні з другою (190,02%) та третьою групами (170,23%).

Вперше в умовах експерименту проведено порівняльний аналіз впливу термінів введення аспірату кісткового мозку на перебіг репаративно-відновних процесів у м'язовій тканині під час денерваційно-реіннерваційного періоду. Продемонстровано що введення аспірату кісткового мозку в гострий період (в умовах експерименту – під час первинного хірургічного втручання) сприяє зменшенню проявів гіпотрофії та набряку цільових м'язів, в той час як його введення у віддалений період – покращує їх реіннервацію (реєстрація більшої кількості потенціалів рухових одиниць).

Виявлено деякі ефекти (такі як збереження довжини саркомерів та кількості скоротливих міофібрил, зменшення продуктів пероксидації ліпідів та збільшення рівнів каталази) впливу аспірату кісткового мозку на перебіг процесу атрофії м'язової тканини у денерваційно-реіннерваційний період. За даними електронної мікроскопії виявлено достовірно ( $p < 0,05$ ) більшу середню довжину саркомерів у 1



групі як прояв їх деструкції та порушення організації актин-міозинових комплексів, чого не спостерігалось в другій та третій групах.

За допомогою нейрофізіологічних методів дослідження виявлено що введення аспірату кісткового мозку сприяє покращенню реіннерваційних процесів у м'язах, що проявляється реєстрацією більшої кількості потенціалів рухових одиниць на всіх етапах експериментального дослідження (у термін 8 тижнів: 1 група –  $8 \pm 0,94$ , 2 група –  $7 \pm 1,67$ , 3 група –  $15 \pm 1,26$ ; 12 тижнів: 1 група –  $28 \pm 3,30$ , 2 група –  $43 \pm 1,46$ , 3 група –  $46 \pm 3,90$ ; 16 тижнів: 1 група –  $38 \pm 1,25$ , 2 група –  $44 \pm 1,60$ , 3 група –  $51 \pm 2,50$ ).

Вперше на основі експериментальних та біохімічних досліджень було вивчено стан пероксидації та ферментів антиоксидантної системи скелетних м'язів в денерваційно-реіннерваційному періоді за умов введення у м'язову тканину аспірату кісткового мозку. Виявлено що атрофія скелетних м'язів характеризувалась різким збільшенням рівня продуктів пероксидації ліпідів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою на 12 і 16 тижні та активності каталази на 12 тижні, а зміни біохімічних показників частково нормалізувались після застосування аспірату кісткового мозку, у більшій мірі при відтермінованому введенні.

**Практичне значення одержаних результатів.** На основі отриманих даних розроблено та впроваджено в клінічну практику технологію введення аспірату кісткового мозку в цільові скелетні м'язи з метою покращення функціональних результатів відновних операцій при ушкодженнях периферичних нервів.

**Особистий внесок автора.** Дисертація є особистою працею здобувача. Автором дисертаційної роботи особисто проведено аналіз сучасного стану питання впливу на гіпотрофію скелетного м'яза в наслідок його денервації, з метою подовження тривалості виживаності скелетного м'яза на різних етапах денерваційно-реіннерваційного процесу. В експерименті досліджено вплив аспірату червоного кісткового мозку на розвиток гіпотрофії та процеси регенерації скелетних м'язів, що протікають в денервованій кінцівці, проведено порівняльну оцінку ефективності введення аспірату кісткового мозку в різні терміни, а також

вивчено вплив на денерваційні процеси у м'язах на ранніх стадіях регенерації та у віддаленому періоді. Отримані дані підтверджені за допомогою електронейроміографічного, рентгенологічних, гістологічних та біохімічних досліджень. З урахуванням отриманих результатів розроблено та впроваджено в клінічну практику технологію введення аспірату червоного кісткового мозку в цільові скелетні м'язи при ураженнях периферичних нервів кінцівок.

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

**Впровадження результатів дослідження.** В практиці відділу «Мікрохірургії та реконструктивної хірургії верхньої кінцівки» ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» застосовано використання аспірату червоного кісткового мозку в цільові скелетні м'язи кінцівок при реконструктивних хірургічних втручаннях на периферичних нервах.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були висвітлені на Міжнародному конгресі хірургів кисті «14th IFSSH 11th IFSHT TRIENNIAL CONGRESS COMBINED FESSH CONGRESS 2019» (м. Берлін, Німеччина, 2019 рік), третій Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 2019 рік), XVIII з'їзді ортопедів-травматології України (м. Івано-Франківськи, 2019 рік), Міжнародному конгресі хірургів кисті FESSH-ON(line)-WEEK (м. Базель, Швейцарія, 2020 рік), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Нейроортопедія: актуальні питання сьогодення та перспективи розвитку» (м. Львів, 2020 рік), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Регенеративні технології

в травматології та ортопедії» (м. Київ, 2021 рік), засіданні Вченої ради ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» (м. Київ, 2021 рік), Двадцять другому міжнародному симпозиумі з хірургії плечового сплетення «22nd International Symposium on Brachial Plexus Surgery» (м. Берлін, Німеччина, 2022 рік), Міжнародному конгресі хірургів кисті «IFSSH, IFSHT & FESSH Combined Congress» (м. Лондон, Великобританія, 2022 рік), Науково-практичній конференції 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 5 наукових праць, з них індексуються у реферативній базі Scopus – 1 стаття, у виданнях що видаються в країнах Європейського Союзу – 1 стаття, у виданнях, включених до переліку наукових фахових видань ДАК МОН України – 3 статті, 9 тез в матеріалах з'їздів та конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація викладена українською мовою на 159 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, 8 розділів, висновків. Ілюстрована 37 рисунками і 10 таблицями. Список літератури містить 180 джерел інформації (3 кирилицею та 177 латиницею). Дисертаційна робота виконана на базі відділення мікрохірургії та реконструктивно-відновної хірургії верхньої кінцівки ДУ «Інституту травматології та ортопедії НАМН України».

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Незважаючи на активний розвиток сучасних медичних технологій, ушкодження периферичних нервів все ще важко піддаються ефективному лікуванню. Основна задача лікування пацієнтів з травмами периферичних нервів полягає в досягненні оптимальної сенсорної та моторної функції без болю чи інших симптомів, як наприклад підвищена чутливість до холоду, тощо. Результат лікування ушкоджень периферичних нервів залежить від багатьох факторів: типу ураженого нерву, рівня його ушкодження (проксимальне чи дистальне ушкодження нерву), тяжкістю ушкодження (це тимчасовий блок проведення викликаний локальною ішемією, чи анатомічне ушкодження нерву), наявності будь-якого дефекту нерву (зі збільшенням розмірів дефекту – ефективність відновлення прогресивно зменшується), наявності відповідних умов до можливості виконання шва нерву (відсутність дії тракційних сил на нерв, відповідність оточуючих параневральних тканин), або ж необхідність виконання реконструкції ураженого нерву (шляхом використання аутонейропластики, аллотрансплантатів чи різних типів кондуїтів), стан цільових м'язів або рецепторів, адекватність середовища в якому знаходиться нерв (відсутність або мінімальні рубцеві зміни, наявність адекватного кровопостачання, та тканин що забезпечують ковзні властивості периферичних нервів), а також здатність головного мозку пристосовуватися до змін периферичної нервової системи що відбулись після травми і відновлення (тобто нейропластичність головного мозку) (Dahlin and Wiberg; Höke). Ефективність відновлення периферичних нервів в переважній більшості досі лишається доволі низькою. Так, за даними різних авторів ефективне відновлення функції цільових м'язів ураженого нерву складає від 40-50% (Bozkurt et al.; Kuffler and Foy) до 65-69% (Murovic; KALLIO et al.; Saur et al.). Проте деякі нерви, такі як ліктьовий чи маломілковий, відновлюються навіть гірше за інші. Так ефективне відновлення ліктьового нерву спостерігалось лише в 54-58% випадків (Murovic; Post et al.).

Метааналіз проведений Ruijs та співавторами у 2005 році вказує що ефективність мікрохірургічного відновлення периферичних нервів у дорослих складає лише 51,6% (Ruijs et al., “Median and Ulnar Nerve Injuries: A Meta-Analysis of Predictors of Motor and Sensory Recovery after Modern Microsurgical Nerve Repair”). Окрім того, зазвичай це травма молодих людей на вершині їх економічної продуктивності (за даними Bekelis та співавторів середній вік пацієнтів складає 39,1 рік (Bekelis et al.)), котра веде до незліченних втрат особистого доходу та перманентного зниження якості життя (Padovano et al.).

Етіологічних чинників, що можуть зумовлювати ураження периферичних нервів, так само багато. Зараз у світі існують ризики великої кількості жертв у зв'язку зі збройними конфліктами (Brown et al.; Roberts et al.), війнами та природними катаклізмами, окрім того не варто виключати побутовий травматизм, нещасні випадки на виробництві, чи дорожньо-транспортні пригоди. Лікування пошкоджень периферичних нервів є складним завданням, особливо у тих випадках коли вони виникають на фоні політравми, адже в останніх випадках будь-які супутні пошкодження кісток, м'язів, сухожилків, судин та шкірних покривів слід враховувати в стратегії лікування (Rochkind et al.; Birch et al., “Nerve Injuries Sustained during Warfare”; Birch et al., “Nerve Injuries Sustained during Warfare”). Підходи до лікування подібних травм мають полягати в оптимальній, активній хірургічній тактиці, де спочатку необхідно виконати ретельний огляд та дебрідмент рани, щоб уникнути інфекцій (Roberts et al.). В подальшому в короткі терміни провести стабілізацію кісткових структур, реконструкцію кровоносних судин та закриття дефектів м'яких тканин повношаровими клаптями, що дозволять проведення подальших реконструкцій. Нажаль в переважній більшості таких випадків відновити цілісність периферичних нервів в оптимальні строки, з точки зору нейробіологічних причин та термінів денервації скелетних м'язів, не є можливим (Dahlin and Wiberg; Saito and Dahlin; Gordon, “Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation”; Gordon et al.). Збільшення термінів від моменту травми до моменту відновлення периферичного нерву призводить до

прогресивного збільшення розмірів його дефекту, що обумовлює необхідність виконання пластики нерву за допомогою аутологічних нервових трансплантатів, забраних локально на тій самій кінцівці, або з використанням литкового нерву (що на сьогодні є «золотим стандартом»), чи використовуючи для цього аллотрансплантати, або різноманітні види нервових кондуїтів (від біологічних до повністю синтетичних). Окремою потенційною проблемою може стати недостатня кількість матеріалу для трансплантата, а також довжина дефекту периферичного нерву, який необхідно перекрити аутоотрансплантатом.

Специфічною, проте дуже важливою проблемою є відновлення функції цільових м'язів, особливо в дистальних сегментах кінцівки, у разі проксимальних чи давніших ушкоджень периферичних нервів. Такі травми мають більший рівень незадовільних результатів лікування, оскільки після відновлення цілісності – аксони повинні регенерувати більші відстані у дистальному кінці нерву від місця ураження, щоб досягти своїх цілей – скелетних м'язів. Зміни що виникають з часом у дистальному сегменті нерву, такі як зменшення просвіту стрічок Бюнгера, апоптоз та міграція шванніських клітин попередників, чи фіброзування дистального нервового волокна за рахунок порушення мікроциркуляції – також веде до погіршення умов для регенерації аксонів (Menorca et al.; S. Y. Fu and Gordon; S. Fu and Gordon; Sulaiman and Gordon). Все це збільшує терміни денервації скелетних м'язів, що призводить до прогресування гіпотрофії, а в деяких випадках навіть розвитку фіброзно-жирового заміщення скелетного м'яза (Bruce M Carlson; Isaacs, “Major Peripheral Nerve Injuries”; Belsh). Що лише підкреслює важливість збереження функції цільових м'язів при лікуванні проксимальних ушкоджень периферичних нервів, а також після відстроченого відновлення нервів (Sarhane et al.). Основна концепція відновлення та реконструкції периферичного нерву полягає в тому, що первинне відновлення є найкращим вибором (Dahlin and Wiberg). Однак доволі часто виконати первинне відновлення неможливо, і потрібна реконструкція, аутонейропластика нерву через ризик натягу на рівні шва. Адже поява тракційних сил призводить до порушення мікроциркуляції в периферичному нерві аж до

повного її припинення, а отже і формування рубця на місці шва нерву (Machado et al.; Wall et al.). Як відновлення, так і реконструкцію периферичного нерву в деяких випадках можна поєднати з розповсюдженими методиками дистальних невротизацій (Garg et al.). Таким чином, скоротивши терміни відновлення цільових м'язів шляхом скорочення відстані яку необхідно подолати аксонам що регенерують до денервованих м'язів. В цьому розділі ми розглянемо які стратегії збереження скелетних м'язів від моменту денервації до моменту їх реіннервації існують на сьогоднішній день, та спробуємо визначити найбільш пріоритетний напрям досліджень в цій проблемі.

### **Патофізіологія денервованих м'язів**

Зміни що відбуваються в скелетному м'язі та призводять до його атрофії після ушкодження периферичного нерву можна розділити на три основні фази що мають різну тривалість. Перша, або рання фаза денерваційного процесу триває близько двох місяців, та характеризується хиткою рівновагою між процесами регенерації та дегенерації м'язових волокон, навіть не зважаючи на той факт що до кінця першого місяця – скелетний м'яз може втратити до 90% своєї ваги. Друга фаза триває від двох до семи місяців, та характеризується прогресивним та неухильним зменшенням регенераторного потенціалу м'язу. І нарешті третя, термінальна, фаза що триває починаючи з 7 місяця від моменту денервації – характеризується мінімальними регенераторними можливостями скелетного м'язу, та прогресуванням глибоких атрофічних змін в м'язовій тканині на морфологічному рівні (Bruce M Carlson). Виникає питання – як довго денервований м'яз зберігає свої фундаментальні морфологічні властивості, що важливо з огляду на час від моменту шва, аутонейропластики або невротизації нерву; це питання, вивчається вже давно і наукові дослідження вказують на ознаки того, що оборотність процесів гіпотрофії можлива в скелетних м'язах і через більш тривалий час після їх денервації (Bowden and Gutmann; Gutmann and Zelená; Gordon et al.). Гістопатологічні зміни в скелетних м'язах після ушкодження нерву описані давно (Gutmann and Zelená). Денерваційні

процеси відбуваються не лише в самих м'язових волокнах. Так найперші зміни з'являються в пресинаптичних шваннівських клітинах і пов'язані з їх апоптозом, проліферацією та міграцією, у разі тривалої денервації. Згодом морфологічні зміни виникають і в постсинапсах скелетних м'язів. Повідомляється, що паралельно з процесами в нейро-м'язових синапсах відбувається і зміна кількості ядер міоцитів, що залежить від виду скелетних м'язів. Активація та централізація сателітних клітин міоцитів, що є ранньою ознакою після перетину периферичного нерву (Bruce M Carlson; Muir et al.). В наслідок атрофії виникає перебудова мікроциркуляторного русла в м'язах, пізні стадії денерваційного процесу та гіпотрофії характеризуються меншою кількістю капілярів, та розвитком фіброзно-жирового заміщення м'язової тканини (Gutmann and Zelená). Регенераторний потенціал скелетного м'яза людини прогресивно зменшується протягом двох років від моменту ушкодження нерву; таким чином визначаючи межу між переважно атрофічною реакцією на денервацію та фазою остаточної дегенерації м'яза (Bruce M Carlson).

Зміни що виникають у скелетному м'язі людини в період його денервації можна діагностувати та спостерігати за їх динамікою за допомогою ультразвукового дослідження (УЗД), магнітно-резонансної томографії (МРТ), гістологічних досліджень м'язів та голкової електронейроміографії (ЕНМГ). Перші ознаки денервації в м'язах спостерігаються за допомогою цих методів дослідження приблизно через 2-3 тижні після ушкодження нерву (Küllmer et al.), і якщо методи УЗД, МРТ та гістологічні дослідження можуть бути використані для документування атрофії м'язів у часі, голкова ЕНМГ дозволяє вивчати динаміку денерваційно-реінерваційного процесу, та визначати прогноз до ефективного відновлення функції м'яза. Перші ЕНМГ ознаки спостерігаються через 2-4 тижні після травми нерву; тобто поява потенціалів фібриляції є електрофізіологічним маркером денервації м'язів, що виникає після пошкодження аксону периферичного нерву (Willmott et al.). Гістологічна картина характеризується помірною атрофією, сплюсненням та подовженням волокон 2 типу, що оточують круглі, нормального розміру або злегка гіпертрофовані волокна 1 типу, котра з часом розвивається далі



(Küllmer et al.). Швидкі м'язові волокна атрофуються швидше, ніж повільні (Bruce M Carlson). Кількість сполучної тканини, яка проявляється у вигляді позаклітинних колагенових фібрил, та кількість жирових клітин поступово збільшується, що можна побачити навіть на ранній стадії (Wechsler and Hager; Gutmann and Zelená).

Денерваційні зміни в скелетних м'язах та їх подальша атрофія супроводжуються складними біохімічними та фізіологічними процесами, де розуміння молекулярних механізмів є важливою основою для подальших стратегій лікування (Shen et al.). Значна кількість генів експресується в різні моменти часу після настання денервації, де найраніші зміни в експресії генів істотно передують морфологічній картині. За допомогою аналізу мікрочипів в експерименті на щурах було визначено чотири різні фази транскрипції генів: «стадія окисного стресу» (одразу після ушкодження аксону до 12 годин), «стадія запалення» (розпочинається приблизно через 24 години), «стадія атрофії (приблизно 3-7 днів)» та «стадія атрофічного фіброзу (14-28 днів)»; автори вказують, що процес атрофії м'язів починається вже через 24 години після травми нерву (Shen et al.), що набагато раніше, ніж структурні зміни які можна спостерігати іншими методами (Küllmer et al.).

Ефективна функція скелетного м'яза також залежить від синапсу між периферичним нервом та м'язом, що складається з пресинапсу (синаптичної бляшки) моторного аксона, синаптичної щілини, постсинаптичної ділянки мембрани саркомера (кінцевої пластинки) та немієлінізуючих термінальних шванівських клітин (Zelada et al.). Суттєві зміни відбуваються у нейро-м'язовому синапсі після пошкодження нерву та при спробах реіннервації (Vannucci et al.). Щоб відновити ефективну функцію м'яза після шва чи пластики нерву, або невротизації необхідно щоб належна кількість аксонів, що регенерують, змогла дорости до нервово-м'язового синапса, та відбулась стабілізація цих синапсів (Zelada et al.). Динамічні патологічні процеси спостерігаються в пресинаптичній частині після пошкодження нерву, тоді як загальна морфологія постсинаптичної частини залишається незмінною між денервацією та реіннервацією, що

інтерпретується як внутрішня стійкість постсинаптичної частини до денервації (Magill et al.; Zelada et al.). Перші зміни що виникають в синапсі після ушкодження периферичного нерву включають розширення відростків термінальних шваннівських клітин в середину синаптичної щілини, та утворення власних синапсів між термінальними шваннівськими клітинами та м'язом. В подальшому, термінальні шваннівські клітини утворюють відростки у напрямку найближчих стрічок Бюнгера, таким чином спрямовуючи аксони, що регенерують, до правильного місця. Після реіннервації термінальних шваннівських клітин, їх відростки, що розташовувались в синаптичній щілині втягуються, таким чином сприяючи утворенню нового нервово-м'язового синапсу (X. Huang et al.). Однак інше спрямування аксонів, яке включає так звані «викликані аксони» (тобто аксони що були спрямовані до синапсу термінальними шваннівськими клітинами), може змінити схему реіннервації (Zelada et al.). Молекулярні та клітинні зміни з між- та внутрішньоклітинною взаємодією також включають складні антероградні та ретроградні сигнали, які зазвичай також стабілізують пре- та постсинаптичні зони, залучаючи, наприклад, сімейство нейрегулінів; таким чином, будучи потенційними мішенями для маніпуляцій. У постсинаптичній зоні метаболічна динаміка пов'язана з популяціями nAChR (нікотинових ацетилхолінових рецепторів), які, по суті, стабільні в нормі, незважаючи на усереднений цикл напіврозпаду в 14 днів. Після денервації існують різні популяції nAChR, які мають різний період напіврозпаду, і стабільність nAChR у сарколемі має вирішальне значення (Zelada et al.). У цьому контексті кінцеві шваннівські клітини, що утворили власні синапси з кінцевою пластинкою, також виділяють речовини, які є важливі для регуляції постсинаптичних білків, та організовують і підтримують нервово-м'язовий синапс. Функція сателітних клітин, які є м'язовими стовбуровими клітинами та розташовані між м'язовими волокнами та їх базальною пластинкою, полягає в тому, щоб бути міогенними попередниками, що утворюють нові або зливаються з пошкодженими м'язовими волокнами (Bruce M Carlson; Wong and Pomerantz). Однак вони також відіграють важливу роль у підтримці нервово-м'язового

синапсу. Дослідження які проводились щодо можливості локального застосування різноманітних факторів, таких як фактор росту ендотелію судин (VEGF), інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1) і гормон росту (GH), показали, що вони можуть сприяти функціональній реіннервації, а також регенерації м'язів, навіть у випадках хронічної денервації (Zelada et al.; Slavin et al.; Lopez et al.; Hanwright et al.; Tuffaha et al.). Інші білки, такі як м'язово-специфічна тирозинкіназа (MuSK), беруть участь як у формуванні, так і в підтримці нервово м'язових синапсів, а також важливі для цілісності та стабілізації синапсу (Punga et al.). Крім того, скелетні м'язи можуть утримувати різні ендогенні рівні MuSK, які можуть визначати здатність утворювати ектопічні кластери nAChR. Нарешті, існує різниця щодо реіннервації малих та великих за розмірами м'язів відповідно до територій рухових одиниць, при цьому значно менші за розмірами скелетні м'язи мають менші території рухових одиниць, на відміну від великих скелетних м'язів, де останні мають набагато більше м'язових волокон (Gordon, "Reinnervated Muscle Fiber Type-Grouping-Inevitable?").

Також існує декілька характеристик скелетних м'язів, які впливають на швидкість їх атрофії та здатність до ефективного відновлення: переважаючий тип м'язових волокон; розмір м'язів; щільність розташування м'язових волокон; кровопостачання м'яза; фізична активність; і використання м'язів в період денервації. Тому атрофічні зміни у дрібних та щільних м'язах кисті, які після їх денервації не виконують жодних фізичних навантажень, більш виражені, ніж м'язів гомілки чи стегна, які, незважаючи на пошкодження нервів, людина продовжує використовувати для ходи та стояння.

### **Роль фізичної терапії: пасивних м'язових рухів, вправ і масажу**

Під час денервації скелетні м'язи зазнають морфологічних змін, що виражається у їх атрофії та зниженні скоротливої здатності (Tanaka et al.). Кінезіотерапія та фізичні вправи в цьому випадку виглядають як найбільш природний і логічний спосіб попередити гіпотрофію скелетних м'язів після травми

нерву. Це призвело до зростання інтересу до ролі різних типів вправ на денервованій м'яз. Багато експериментальних досліджень показали потенційну корисність вправ для реіннервації скелетних м'язів, підвищення сили та відновлення м'язової маси (Maugeri et al.).

Баланс між гіпо- та гіпертрофією м'язів контролюється внутрішньоклітинними сигнальними каскадами синтезу та трансляції білків, які також координують регуляцію систем протеолітичної та аутофагічної деградації. Денервація скелетного м'язу проявляється також порушенням мітохондріальної функції та мішенню для рапаміцину ссавців (mTOR), зокрема mTORC1 (Graham et al.). Повідомлялося, що сигнальний каскад, Akt/mTOR/70-кДа рибосомальна протеїн-кіназа S6 (p70S6K) та/або еукаріотичний фактор ініціації 4E, зв'язуючий білок 1 (4E-BP1), бере участь у гіпертрофії м'язів, стимульованій інсуліноподібним фактором росту 1. У денервованих м'язах – розтягування або скорочення збільшує експресію мРНК IGF-1 у міоцитах і підвищує концентрацію IGF-1. Що активує Akt через аутокринний/паракринний механізм (Agata et al.). Активація Akt не тільки сприяє синтезу м'язового білка через mTOR, але також знижує регуляцію кількох генів убіквітину-протеасоми, таких як атрогін-1 і м'язовий білок RING-finger-1 (MuRF1) (активатори деградації білка) і підтримує рівень Runt-протеасом споріднений фактор транскрипції-1 (Runx1) (який контролює аутофагію) (Hadj-Saïd et al.), шляхом негативної регуляції транскрипційного Forkhead box O фактора (FOXO) (Y. Wang et al.). Багато досліджень *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo* показали, що фізичні вправи активують сигнальні молекули (Akt, mTOR, p70S6K, 4E-BP1) і запобігають атрофії м'язів, спричиненій денервацією.

Досі немає єдиної думки про те, який вид фізичних навантажень краще, який режим і яка тривалість. Проте найбільш популярними видами вправ є наступні: пасивне повторюване розтягування м'язів (Y. Wang et al.), пасивне навантаження (Shiyang et al.), пасивні локомоторні тренування (Hadj-Saïd et al.), вправи на збереження діапазону рухів (Rahiminezhad et al.), тренування проти опору (Messi et al.), високоінтенсивні інтервальні тренування (Tayebi et al.), і плавання (Santana et

al.). Більшість із цих програм – це протоколи розроблені для використання в домашніх умовах, які можуть бути застосовані з різною частотою: від одного-двох разів на тиждень, 3-4 рази на тиждень та щоденні сеанси. Тривалість кожного заняття становить близько 45-50 хвилин (de Santana Chagas et al.).

Інший вид фізичної терапії – м'язовий масаж. Механічний тиск може зняти м'язові спазми (техніка релаксації), зменшити подразнення нервів і симпатичну активність, а також збільшити кровообіг та об'єм м'язів (Rahiminezhad et al.).

### **Роль фізіотерапії та електростимуляції для збереження м'язової тканини після пошкодження периферичних нервів**

Ще в 1855 році Рейнольдс показав, як електрична стимуляція м'язової тканини призводить до її скорочення, яке є таким же, як довільний рух (Reynolds). Ідея, що це можна використовувати в терапевтичних цілях для підтримки м'язової сили, зменшення м'язової втоми та полегшення болю (Ni et al.) після травм периферичних нервів є відносно новою та мало вивченою на пацієнтах. Теоретично, оптимальне терапевтичне вікно, коли електрична стимуляція може бути ефективною, залежить від того, наскільки вираженою є дегенерація м'язу за рахунок його атрофії, та фіброзно-жирового заміщення. Ці незворотні зміни зазвичай відбуваються в скелетному м'язі в термін від одного до трьох років після травми і часто збігаються з часом реіннервації. Саме протягом цього часу певний ступінь скорочувальної м'язової активності може бути корисним для підвищення регенераційної здатності скелетних м'язів дистально від рівня ураження нерву.

Пристрої для функціональної електростимуляції (FES) можуть або зосереджуватися на короткочасній стимуляції проксимальної кукси нерву теоретично з метою прискорення активації регенерації нерву в місці пошкодження (Zuo et al.), встановлені на нерві перед нервово-м'язовим синапсом, з метою викликати скорочення м'язу (Polasek et al.; Tigra et al.; Coste et al.), або проводячи електричну стимуляцію безпосередньо м'язової тканини з метою підтримки м'язових скорочень під час регенерації нерву. Різні питання пов'язані з кожним із

цих підходів, це і конструкція електрода, і передача електричних сигналів, частота стимуляції та узгодження механічних властивостей між електродом і оточуючими тканинами є лише деякими з них. Однією з переваг стимуляції нервово-м'язових синапсів зі сторони периферичного нерву є використання меншої кількості електродів і менші потреби в енергії (приблизно 10% порівняно з тим самим скороченням при прямій стимуляції м'яза) (Pellot-Cestero et al.). З нижчими вимогами до високих струмів також легше виробляти стимулюючі пристрої, які повністю імплантуються, у яких усі електроди та електронні модулі розміщуються під шкірою під час однієї хірургічної процедури та заряджаються бездротовим способом. Нові складні розтяжні багатоелектродні манжети, які мають модуль Юнга, подібний до модуля нерву, мають здатність вибірково стимулювати субпучки для покращення селективності лікування та подальшого зменшення прикладених зарядів (Lienemann, Donahue, et al.; Lienemann, Zötterman, et al.).

Проте використання пристроїв для функціональної електростимуляції периферичних нервів є доцільним лише у випадках ураження спинного мозку, або дегенеративних захворювань нервової чи м'язової системи. Оскільки у вище зазначених станах зберігається цілісність, а отже і нормальна фізіологія периферичного нерву. В той же час у разі травматичного ушкодження периферичного нерву – в його дистальному сегменті відбувається процес Валерівської дегенерації, що призводить до руйнування нервового волокна, і відповідно до неможливості проведення ним електричних імпульсів.

Пряма електрична стимуляція денервованого м'яза за допомогою пристроїв FES експериментально використовувалася на моделях тварин протягом багатьох років (Nix; Dow et al.; Kern et al.; Ashley, Salmons, et al.; Ashley, Sutherland, et al.), однак впровадження в клінічну практику відбувається повільно, значною мірою тому, що досі не визначено оптимального протоколу електричної стимуляції м'яза (частота, інтенсивність, тривалість) (Pinto Damo et al.). Пристрої FES можна застосовувати на поверхні шкіри (черезшкірні електроди), імплантувати безпосередньо в м'яз (внутрішньом'язові електроди) або вздовж поверхні м'яза

(епімізіальні). Черезшкірні електроди подають струм на більші області, стимулюючи цілі групи м'язів, але водночас зменшуючи щільність струму. Хірургічна імплантація внутрішньом'язових електродів може спричинити пошкодження м'язової тканини, тоді як епімізіальні електроди можуть дозволити цілеспрямовану стимуляцію визначених м'язів, мінімізуючи інвазивність самого електрода (Guo et al.; Srinivasan et al.; McAvoy et al.).

Досі неясно, як саме стимульовані FES м'язові скорочення впливають на регенерацію м'язової тканини і якою мірою це впливає на центральну нервову систему (Ni et al.). Існує гіпотеза, що регенерація міоцитів стимулюється через регуляцію фактору росту ендотелію судин та інсуліноподібного фактора росту (S. J. Park et al.; von Roth et al.), і створення позитивного впливу на регенерацію аксонів (von Roth et al.). Вважається, що FES також покращує регенеративну здатність скелетних м'язів збільшуючи проліферацію міогенних клітин-попередників і полегшуючи їх злиття зі зрілими міоцитами (Di Filippo et al.; Khodabukus et al.).

Оскільки є повідомлення про суперечливі результати впливу FES на денервовані м'язи (Gigo-Benato et al.; Piccinini et al.), майбутнім напрямком цієї галузі буде визначення факторів для персоналізації протоколів лікування. Деякі дослідження вказують на те, що між інтенсивністю лікування FES та ефективністю існує взаємозв'язок доза-реакція (Maffiuletti et al.), і що деякі пацієнти можуть навіть розглядатися як «не відповідачі» або можуть відчувати побічні ефекти від лікування (Maffiuletti et al.). Вважається, що нефізіологічна висока інтенсивність стимуляції призводить до невпорядкованого залучення рухових одиниць, що, у свою чергу, може спричинити швидку м'язову втому та травмувати скелетний м'яз (Gregory and Bickel; Fouré et al.). Короткотривала низькочастотна електрична стимуляція, ймовірно, найкращий спосіб збільшити витривалість м'язу без шкоди для м'язових одиниць (Gordon and Tyreman), однак чітких рекомендацій щодо клінічного застосування такого типу електростимуляції ще немає.

Не зважаючи на хороші результати що демонструє певна група авторів – до використання електростимуляції у разі ураження периферичних нервів та на етапах

ранньої реіннервації скелетних м'язів варто ставитись з обережністю. Так наведене вище експериментальне дослідження на щурах проведене Gino-Benato та співавторами – демонструє негативний вплив електростимуляції на ранніх етапах реіннервації при ушкодженні сідничного нерву у щурів (Gigo-Benato et al.). Інше мультицентрове, подвійно сліпе, рандомізоване дослідження що було проведене Pisciini та співавторами на великому масиві пацієнтів з ушкодженнями периферичних нервів в південній Америці показало відсутність ефекту електростимуляції на денервованій м'яз (Pisciini et al.).

Існують і інші фізіотерапевтичні методи, окрім електростимуляції, які привернули увагу як можливі методи покращення регенерації нервів та збереження м'язової тканини. До них відноситься стимуляція магнітним полем (Yang et al.; Bademoğlu et al.), лазерна стимуляція (Sene et al.), і імпульсний ультразвук низької інтенсивності (Peng et al.). Загальноприйняте переконання полягає в тому, що ці методи можуть посилити процеси загоєння тканин шляхом інгібування запалення (Khanna et al.), та провокувати диференціацію стовбурових клітин (Lin et al.; Lv et al.; Tan et al.). Проте їх роль у поточних протоколах лікування ушкоджень периферичних нервів потребує уточнення, оскільки існує недостатня кількість даних, які необхідні, перш ніж їх можна буде ввести в клінічні дослідження.

### **Медикаментозна терапія**

На сьогоднішній день не існує жодних ліків схвалених для клінічного використання, які можуть уповільнити або зупинити гіпотрофію скелетних м'язів після пошкодження периферичного нерву (Otzal et al.; Yin et al.). Проте було виявлено декілька перспективних доклінічних стратегій. Зазвичай використовуються поживні речовини, природні та хімічні речовини, протизапальні препарати та антиоксиданти, гормони, ферменти та інгібітори ферментів (L. Huang et al.).

- Поживні речовини, такі як білки та амінокислоти – відіграють важливу роль у підтримці синтезу м'язового білка та запобіганні атрофії м'язів.



Рекомендується споживання 1,0-1,2 г/кг/день дієтичного білка для підтримки м'язової маси (Yin et al.).

- Натуральні речовини: тетраметилпіразин (*Ligusticum Wallichii* Franchat), салідрозид (Родіола рожева), байкалін (*Scutellaria Baicalensis*), ізофлавіон і пуерарин (Соя), епікатехін і актеозид (Зелений чай), урсолова кислота (Яблучна шкірка), коріфол А (*Psoralea Corylifolia*), ресвератрол (Виноград, Ягоди, Арахіс) та інші в основному запобігають атрофії м'язів через протизапальні та антиоксидантні механізми (L. Huang et al.; Sakuma and Yamaguchi; Otzel et al.; Yin et al.; L. Chen et al.).
- Такі хімічні речовини, як тоциліумаб, руксолітиніб, C188-9, малотилат та імідазоло-оксиндол, можуть запобігти атрофії м'язів завдяки протизапальній дії (L. Huang et al.).
- Є кілька досліджень, які показали потенційну роль антиоксидантів (мелатоніну, коензиму Q10, креатину, вітамінів С, D і Е, капсаїцину, N-ацетил-L-цистеїну та пірролохінолінхінону) на зменшення проявів гіпотрофії скелетних м'язів (L. Huang et al.; Kostrominova).
- Як природний андроген, тестостерон може викликати гіпертрофію м'язових волокон і збільшити об'єм м'язів (Yin et al.). Крім того, він збільшує синтез м'язового білка та має потенційну антиапоптозну дію на м'язи (L. Huang et al.; Sakuma and Yamaguchi). Однак він має великий ризик розвитку різних ускладнень і навіть раку (L. Chen et al.; Otzel et al.). Щоб уникнути цих побічних ефектів, були розроблені селективні модулятори андрогенних рецепторів (Енобосарм) (L. Huang et al.; L. Chen et al.).
- Різні дослідження показали, що агоністи  $\beta$ 2-адренорецепторів (формотерол, кленбутерол, еспіндолол і метапротеренол) можуть покращити об'єм та силу м'язів у осіб із гострою денервацією внаслідок ушкодження периферичних нервів (L. Chen et al.; Otzel et al.).
- Інгібітори ЦОГ-1 і ЦОГ-2 (аспірин, целекоксиб, мелоксикам) можуть ефективно зменшити атрофію м'язів, спричинену денервацією, шляхом

регулювання сигнальних шляхів запалення (L. Huang et al.; Wan et al.; L. Chen et al.; Sakuma and Yamaguchi).

- Інгібітор гістондеацетилази – трихостатин А можна використовувати як препарат-кандидат для запобігання атрофії м'язів (L. Huang et al.). У період денервації він зменшує експресію атрогену та контролює м'язову масу шляхом зниження активності HDAC4 та експресії міогеніну і підвищення рівня Dach2 (L. Chen et al.; Sakuma and Yamaguchi).
- Інгібітори фосфодіестерази (ФДЕ) (селективні: роліпрам, ціломіласт, рофлуміласт або неселективні: торбафілін і пентоксифілін) в експерименті на тваринних підтвердили зменшення проявів атрофії скелетних м'язів. Інгібування активності PDE призводить до стимуляції антипротеолітичного ефекту при атрофії м'язів, опосередкованій PDE4/cAMP/Еrac/PI3K/Akt (L. Huang et al.; L. Chen et al.).
- Недавні дослідження виявили, що гомолог alkB 5 альфа-кетоглутарат-залежної діоксигенази може контролювати м'язову масу дорослої людини при атрофії скелетних м'язів, спричиненій денервацією (L. Huang et al.).

### **Хірургічні процедури**

Невротизація по типу додаткової невротизації кінець-в-бік (Supercharge End-to-Side – SETS) — це хірургічна процедура, яка теоретично може відновити нейротрофічний вплив на цільові м'язи до моменту їх реіннервації (von Guionneau et al.).

Суть такого хірургічного втручання полягає у виконанні одночасно з відновленням цілісності нервового стовбура – додаткової дистальної невротизації по типу кінець-в-бік з метою як можна швидшої доставки аксонів до цільових м'язів та відновлення нейротрофічного контролю над м'язами до моменту остаточної їх реіннервації. Найбільш поширеним та типовим прикладом є дистальна додаткова невротизація по типу кінець-в-бік рухової фасцикули

ліктьового нерву гілочкою переднього міжкісткового нерву до м'яза квадратного пронатора при проксимальних ушкодженнях ліктьового нерву.

І хоча ефективність додаткової невротизації по типу кінець-в-бік була доведена експериментально (Daniel et al.; Zavala et al.). У клінічній практиці досі ведуться деякі дискусії щодо їх ефективності (Head et al.; Davidge et al.; Isaacs, “Reverse End-to-Side (Supercharging) Nerve Transfer: Conceptualization, Validation, and Translation”). Що, зокрема, може бути викликано відсутністю стандартизації таких оперативних втручань (потреба у створенні епіневрального чи периневрального вікна, розташування анастомозу та ін.).

### **Регенеративна медицина**

Протягом останніх двох десятиліть ідея відновлення функції пошкоджених органів шляхом стимулювання внутрішніх механізмів відновлення самого органу привертає все більше уваги (Mason and Dunnill). В організмі людини існують два основні внутрішні механізми відновлення: локальний синтез і вивільнення трофічних факторів, які можуть стимулювати і регулювати процес регенерації тканин, а також залучення й активація стовбурових клітин, які замінюють дегенеровані клітини, відновлюючи пошкоджений орган. Третій внутрішній механізм відновлення, який почали досліджувати лише нещодавно – це регенерація тканин, опосередкована мікробіотою, яка населяє наше тіло. Усі ці механізми відновлення також були доведені для скелетних м'язів у перспективі лікування пошкоджень, пов'язаних з денервацією.

Історія трофічних факторів бере початок багато років тому з піонерськими дослідженнями Ріти Леві Монтальчіні щодо фактору росту нервів (NGF) (Levi-Montalcini). З тих пір було ідентифіковано ряд молекул, які відіграють передбачувану роль у сприянні та регулюванні процесів регенерації в усіх тканинах і органах. Багато молекул, які відіграють таку роль, були ідентифіковані також для скелетних м'язів, включаючи, якщо згадати лише кілька прикладів: інсуліноподібний фактор росту 1 (Hanwright et al.), Інтерлейкін 4 (IL-4) (Kurosaka

et al.), і грелін (GHR) (Porporato et al.). Незважаючи на величезну кількість доклінічних досліджень, які продемонстрували позитивний вплив багатьох трофічних факторів на збереження та регенерацію м'язів після денервації, клінічне застосування їх є доволі обмеженим. Причину цієї невітної невідповідності між фундаментальними дослідженнями та клінічним застосуванням (що також стосується клінічного застосування трофічних факторів для регенерації інших тканин і органів) важко зрозуміти. Окрім загальних міркувань про слабкість доклінічних моделей з точки зору їх передбачуваності результатів у клінічних умовах (що з'являється в багатьох медичних дисциплінах), більш конкретним елементом, який стосується трофічних факторів, є те, що кожен трофічний фактор діє не окремо, а в синергії з багатьма іншими, і, хоча ми отримали багато інформації про вплив окремих факторів, дуже мало відомо про синергетичну дію багатьох трофічних факторів разом.

Подібні міркування також можуть бути справедливими для другого основного внутрішнього механізму регенерації тканин у нашому організмі, а саме стовбурових клітин. Хоча знання про біологію та функції стовбурових клітин були накопичені нещодавно порівняно з трофічними факторами, так звана «революція стовбурових клітин» бере свій початок у кінці двадцятого століття (Mezey et al.), після більш ніж 20 років масштабних фундаментальних і доклінічних досліджень застосування стовбурових клітин у клінічних умовах було дуже обмеженим (Sumarwoto et al.). Підходи до трансплантації стовбурових клітин для збереження скелетних м'язів у разі їх атрофії, пов'язаної з денервацією, поки що були контраверсійними, те саме стосується маніпуляцій із резидентними стовбуровими клітинами м'язів для сприяння регенерації м'язів (Tavakoli et al.). Причини можуть бути подібними до тих, що вже описані для використання трофічних факторів, з додатковим недоліком, що терапії, засновані на трансплантації клітин, мають більший ризик з точки зору потенційної неопластичної еволюції після трансплантації.

Досі немає чіткого розуміння того, як терапія стовбуровими клітинами може бути впроваджена в клінічну практику. Є експериментальні (Abbas et al.; Farjah et al.), та клінічні дослідження (Hogendoorn et al.) які демонструють переваги збереження м'язів після ін'єкції концентрованого аутологічного аспірату червоного кісткового мозку в денервовані м'язи. Водночас кілька вчених також описують невдачу в спробах маніпулювати резидентними стовбуровими клітинами м'язів для сприяння регенерації м'язів (Tavakoli et al.).

Щодо механізму відновлення тканин, пов'язаного з мікробіотою, то в даному випадку, оскільки фундаментальні наукові результати були накопичені зовсім недавно, очевидно що прогалину до клінічного використання ще рано усунути. Потенціал використання мікробіот, особливо для регенерації нервової тканини, де термін «нейробиотики» був винайдений, щоб вказати на можливість впливу на мікробіоту для лікування неврологічних захворювань є доволі високим (Herrera-Rincon et al.). Також для скелетної мускулатури є дуже багатообіцяючі перспективи. Було припущено, що вплив на кишкову мікробіоту може зменшити прояви прогресування захворювань, пов'язаних з атрофією м'язів, на тваринних моделях, проливаючи світло на можливість модуляції кишкової мікробіоти для збереження та регенерації скелетних м'язів після денервації (S. Chen et al.). Для прикладу було продемонстровано що введення *Lactobacillus rhamnosus* покращує регенерацію довгого м'яза розгинача пальців у мишей (Jabeen and Qazi).

Як показують численні дослідження – використання аутологічних стромальних стовбурових клітин червоного кісткового мозку є багатообіцяючим напрямом наукових досліджень. Існує значна кількість досліджень що вказує на можливість диференціації стовбурових клітин червоного кісткового мозку у шваннівські клітини та сателітні клітини міоцитів, що може бути джерелом поновлення регенераторного потенціалу м'язу (Kumar et al.; BRAGA-SILVA et al.; Cuevas et al.; Goel et al.). Використання аутологічних матеріалів є безпечною та економічно вигідною технологією. А сама методика забору, обробки та введення

стовбурових клітин червоного кісткового мозку – є доволі простою що дає змогу легко імплементувати її в клінічну практику.

Зважаючи на високу актуальність проблеми, відсутності єдиного консенсусу щодо використання методів фізичної терапії, контраверсійні дослідження впливу фізіотерапевтичних методів таких як електростимуляція, відсутність медикаментозних методів впливу на гіпотрофію м'язів, проте значний потенціал технологій регенеративної медицини ми вирішили провести експериментальне дослідження з метою вивчення впливу аспірату кісткового мозку на скелетний м'яз в денерваційно-реіннерваційний період.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1 Методика проведення експерименту

Матеріали дисертаційного дослідження склали результати ряду експериментів з моделювання травматичного ушкодження периферичного нерву і його відновлення та визначення впливу аспірату кісткового мозку на скелетний м'яз кінцівки в денерваційно-реіннерваційний період. Експериментальні дослідження були проведені на кролях (порода Шиншила) вагою  $3,23 \pm 0,32$  кг. Експериментальних тварин утримували в умовах клініки для експериментальних тварин на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі та води. Премедикацію та знеболення дослідних тварин під час всіх хірургічних втручань здійснювали шляхом інтраперитонеального введення розчину Тіопенталу натрію (міжнародна непатентована назва: Thiopental sodium) (і.р., 60 мг/кг), через 10 хвилин після введення – відзначалось значне зменшення фізичної активності тварини, при збереженому диханні, проводили фіксацію дослідної тварини на операційному столі. 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 травматичного ушкодження сідничного нерву, його мікрохірургічному відновленні, та у відповідних групах введенні очищеного аутологічного аспірату кісткового мозку в м'язи гомілки одномоментно, чи у віддалений період (через 7 тижнів після першого хірургічного втручання що співпадало з початковими етапами реіннервації).

Після введення експериментальних тварин в наркоз хірургічні втручання проводились відповідно до розподілу у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Розподіл дослідних тварин на групи

№	Група	Термін спостереження / кількість тварин			Всього	Хірургічні втручання та маніпуляції
		8 тижнів	12 тижнів	16 тижнів		
1	2	3	4	5	6	7
1	Нейротомія та нейрорафія	3	3	3	9	Тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, нейротомія та нейрорафія сідничного нерву. Тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту.
2	Нейротомія, нейрорафія та одночасне введення аспірату кісткового мозку	3	3	3	9	Тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, нейротомія та нейрорафія сідничного нерву, забір та введення очищеного аспірату кісткового мозку в м'язи гомілки. Тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту.
3	Нейротомія, нейрорафія та введення аспірату кісткового мозку через 7 тижнів	3	3	3	9	Тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, нейротомія та нейрорафія сідничного нерву.  Через 7 тижнів: тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, забір та введення очищеного аспірату кісткового мозку в м'язи гомілки. Тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту.



1	2	3	4	5	6	7
4	Контроль	3	3	3	9	Тіопентал натрію (50 мг/кг) для наркозу, ревізія сідничного нерву. Тіопентал натрію (50 мг/кг) для виведення тварин з експерименту.

Таким чином, окрім контрольної групи у нас утворилось три дослідні групи:

- 1) Перша дослідна (основна) група (n=9) – група де виконували нейротомію та накладання шва нерву без застосування клітинних технологій.
- 2) Друга дослідна (з одночасним введенням аспірату кісткового мозку) група (n=9) – група в якій після шва сідничного нерву виконували введення аспірату кісткового мозку в м'язи гомілки.
- 3) Третя дослідна (з віддаленим введенням аспірату кісткового мозку) група (n=9) – група в якій введення аспірату кісткового мозку виконували через 7 тижнів після шва сідничного нерву.
- 4) Контрольна група (n=9) – група з мобілізацією сідничного нерву.

Включення контрольної групи в експеримент було пов'язано з отриманням початкових рентгенологічних, електронейроміографічних, гістоморфологічних показників та проведенням біохімічного дослідження після доступу до нерву (порушення мезоневрію). Особливе значення надавали отриманню первинних показників. Відомо, що деякі ранні та хронічні прояви денерваційно-реіннерваційного процесу можна виявити за допомогою таких додаткових методів обстеження як ЕНМГ, МРТ та КТ. Розглянуті біохімічні показники характеризують окисну модифікацію білків та ліпідів у пошкоджених тканинах та механізми боротьби з цим. З метою визначити, чи має позитивний ефект застосування очищеного аспірату кісткового мозку на ці процеси, в подальшому проводили порівняння результатів дослідних груп з контрольною.

*Протокол оперативного втручання в контрольній групі (рис. 2.1):*

Операційне поле звільнене від шерстяного покриву шляхом його вистригання. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом. Виконано лінійний поперечний доступ, по тильній поверхні правого стегна, в проекції великого вертлюга стегнової кістки та кульшового суглоба. Після розсічення фасції виконано мобілізацію двоголового м'яза стегна і м'яза що напружує широку фасцію стегна та розведення їх в сторони за допомогою автоматичного ранорозширювача. При ревізії інтраопераційної рани виявлено: нормальну анатомічну будову та місцезосташування правого сідничного нерву. Сідничний нерв виділено з параневральних тканин, та мобілізовано. Визначено наявність великогомілкової та малогомілкової порцій. Після чого виконано ушивання шкіри безперервним обвивним швом з використанням монофіламентної хірургічної нитки що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 2/0. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом.



Рисунок 2.1 – Фото. Методика проведення хірургічного втручання в контрольній групі (де виконували лише мобілізацію сідничного нерву).

У зв'язку з високим регенеративним потенціалом периферичних нервів крілів та з метою дослідження ефективності введення аспірату червоного кісткового мозку в цільові м'язи – шов сідничного нерву в дослідних групах навмисно виконувався таким чином – щоб погіршити умови реіннервації.

*Протокол оперативного втручання в першій дослідній групі (рис. 2.2):*

Операційне поле звільнене від шерстяного покриву шляхом його вистригання. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом. Виконано лінійний поперечний доступ, по тильній поверхні правого стегна, в проекції великого вертлюга стегнової кістки та кульшового суглоба. Після розсічення фасції виконано мобілізацію двоголового м'яза стегна і м'яза що напружує широку фасцію стегна та розведення їх в сторони за допомогою автоматичного ранорозширювача. При ревізії інтраопераційної рани виявлено: нормальну анатомічну будову та місцезосташування правого сідничного нерву. Сідничний нерв виділено з параневральних тканин, та мобілізовано. Визначено наявність великогомілкової та малогомілкової порцій. Проведено пересічення сідничного нерву на рівні проксимальної третини стегна. Монофіламентною хірургічною ниткою що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 7/0 накладено два шва по типу кінець-в-кінець з використанням мікрохірургічної техніки. З метою погіршення умов реіннервації шов нерву накладено через всю товщу, зі значним натягом, та без адаптації кінців. Після чого виконано ушивання шкіри безперервним обвивним швом з використанням монофіламентної хірургічної нитки що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 2/0. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом.

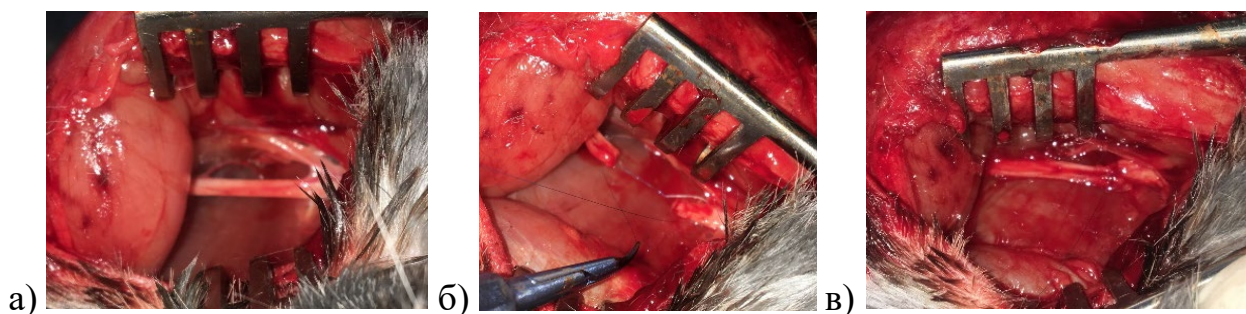


Рисунок 2.2 – Фото. Методика проведення хірургічного втручання в першій дослідній групі: а) візуалізація сідничного нерву; б) виконано нейротомію

сідничного нерву; в) вигляд сідничного нерву після накладання мікрохірургічного шва.

*Протокол оперативного втручання в другій дослідній групі (рис. 2.3):*

Операційне поле звільнене від шерстяного покриву шляхом його вистригання. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом. Виконано лінійний поперечний доступ, по тильній поверхні правого стегна, в проекції великого вертлюга стегнової кістки та кульшового суглоба. Після розсічення фасції виконано мобілізацію двоголового м'яза стегна і м'яза що напружує широку фасцію стегна та розведення їх в сторони за допомогою автоматичного ранорозширювача. При ревізії інтраопераційної рани виявлено: нормальну анатомічну будову та місцезорозташування правого сідничного нерву. Сідничний нерв виділено з параневральних тканин, та мобілізовано. Визначено наявність великогомілкової та малогомілкової порцій. Проведено пересічення сідничного нерву на рівні проксимальної третини стегна. Монофіламентною хірургічною ниткою що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 7/0 накладено два шва по типу кінець-в-кінець з використанням мікрохірургічної техніки. З метою погіршення умов реіннервації шов нерву накладено через всю товщу, зі значним натягом, та без адаптації кінців. У 5 мл шприц набрано 0,2 мл 4% розчину АСD-А. За допомогою голки діаметром 1,2 мм виконано прокол шкіри в проекції великого вертлюга стегнової кістки. В подальшому прокручуючими рухами виконано просвердлювання зовнішнього кортикального шару стегнової кістки, та занурення голки до внутрішнього кортикального шару. За допомогою провідника товщиною 0,9 мм – голку прочищено від залишків кістки що потрапили у середину голки. До голки під'єднано шприц, та виконано забір 2 мл аспірату кісткового мозку. Голку видалено, місце проколу оброблене дезінфектантом. Аспірат кісткового мозку очищено від частинок спонгіозної кісткової тканини завдяки фільтру-подрібнювачу для аспірату підшкірної жирової клітковини. До шприца з очищеним аспіратом

кісткового мозку під'єднано ін'єкційну голку товщиною 0,6 мм. Очищений аспірат кісткового мозку введено м'язи гомілки (*m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior*) справа. Виконано ушивання шкіри безперервним обвивним швом з використанням монофіламентної хірургічної нитки що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 2/0. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом.

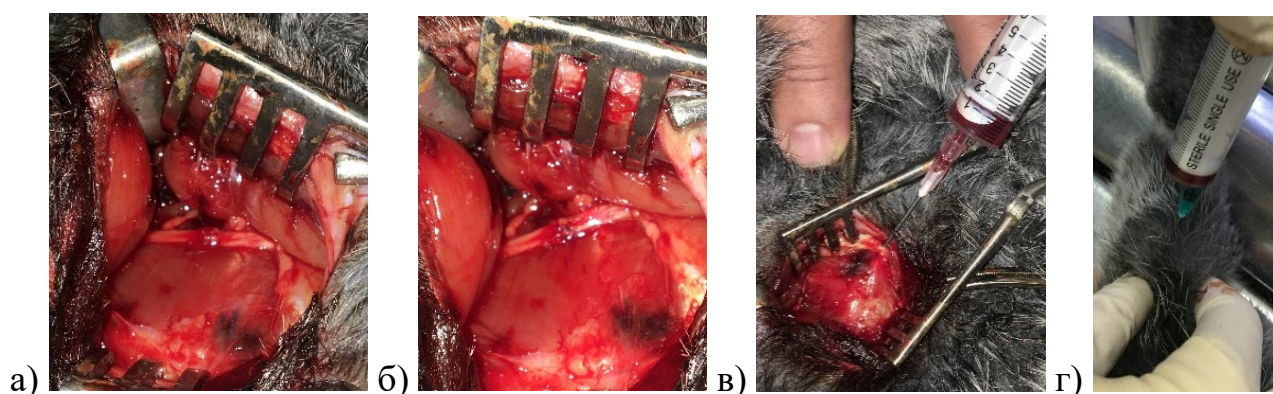


Рисунок 2.3 – Фото. Методика проведення хірургічного втручання в другій дослідній групі: а) візуалізація сідничного нерву; б) вигляд сідничного нерву після проведення нейрорафії; в) забір аспірату кісткового мозку з великого вертлюга стегнової кістки; г) введення аспірату кісткового мозку в м'язи гомілки.

#### *Протокол оперативного втручання в третій дослідній групі:*

Перше оперативне втручання:

Операційне поле звільнене від шерстяного покриву шляхом його вистригання. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом. Виконано лінійний поперечний доступ, по тильній поверхні правого стегна, в проекції великого вертлюга стегнової кістки та кульшового суглоба. Після розсічення фасції виконано мобілізацію двоголового м'яза стегна і м'яза що напружує широку фасцію стегна та розведення їх в сторони за допомогою автоматичного ранорозширювача. При ревізії інтраопераційної рани виявлено: нормальну анатомічну будову та місцезоташування правого сідничного нерву. Сідничний нерв виділено з параневральних тканин, та мобілізовано.

Визначено наявність великогомілкової та малогомілкової порцій. Проведено пересічення сідничного нерву на рівні проксимальної третини стегна. Монофіламентною хірургічною ниткою що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 7/0 накладено два шва по типу кінець-в-кінець з використанням мікрохірургічної техніки. З метою погіршення умов реіннервації шов нерву накладено через всю товщу, зі значним натягом, та без адаптації кінців. Виконано ушивання шкіри безперервним обвивним швом з використанням монофіламентної хірургічної нитки що не розсмоктується (хімічна речовина Поліпропілен) 2/0. Операційне поле тричі (по 1,5 хвилини до повного висихання) оброблене дезінфектантом.

Друге оперативне втручання (через 7 тижнів після першої операції – на початкових етапах реіннервації цільових м'язів):

У 5 мл шприц набрано 0,2 мл 4% розчину АСD-А. За допомогою голки діаметром 1,2 мм виконано прокол шкіри в проекції великого вертлюга стегнової кістки. В подальшому прокручуючими рухами виконано просвердлювання зовнішнього кортикального шару стегнової кістки, та занурення голки до внутрішнього кортикального шару. За допомогою провідника товщиною 0,9 мм – голку прочищено від залишків кістки що потрапили у середину голки. До голки під'єднано шприц, та виконано забір 2 мл аспірату кісткового мозку. Голку видалено, місце проколу оброблене дезінфектантом. Аспірат кісткового мозку очищено від частинок спонгіозної кісткової тканини завдяки фільтру-подрібнювачу для аспірату підшкірної жирової клітковини. До шприца з очищеним аспіратом кісткового мозку під'єднано ін'єкційну голку товщиною 0,6 мм. Очищений аспірат кісткового мозку введено м'язи гомілки (*m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior*) справа.

В залежності від групи та термінів, експериментальних тварин виводили з дослідження через 8, 12 та 16 тижнів після моделювання травматичного ушкодження сідничного нерву з його подальшим відновленням (по 3 тварини на кожен термін експериментального дослідження). Також включено тварин



контрольної групи. Отже до подальших досліджень було включено 9 дослідних груп та 3 контрольні (по 3 дослідні та 1 контрольній групі на кожен термін експериментального дослідження). Детальний розподіл наведений у таблиці 2.1. Перед виведенням експериментальним тваринам в той же день виконували клінічну оцінку проявів денервації кінцівки, голкову електронейроміографію м'язів гомілки, магнітно-резонансну томографію та комп'ютерну томографію. Після виведення тварин з експерименту зразки м'язів оперованої кінцівки та ділянки шва сідничного нерву було забрано для проведення гістологічного та електронно-мікроскопічного досліджень. З метою проведення біохімічного дослідження виконувався забір скелетних м'язів.

## 2.2. Визначення клінічних проявів денервації кінцівки тварин

Під час огляду дослідних тварин перед їх виведенням з експерименту проводили визначення клінічних проявів денервації кінцівки визначаючи наявність трофічних виразок, ознак аутофагії частин кінцівки де виконувалась денервація (типовий вигляд трофічної виразки та ознаків аутофагії сегментів кінцівки наведено на рисунку 2.4), визначалась наявність переломів кісток уражених кінцівок та незрощень. За виявлення трофічних виразок виконувалось вимірювання їх розмірів, та фотофіксація ускладнень.

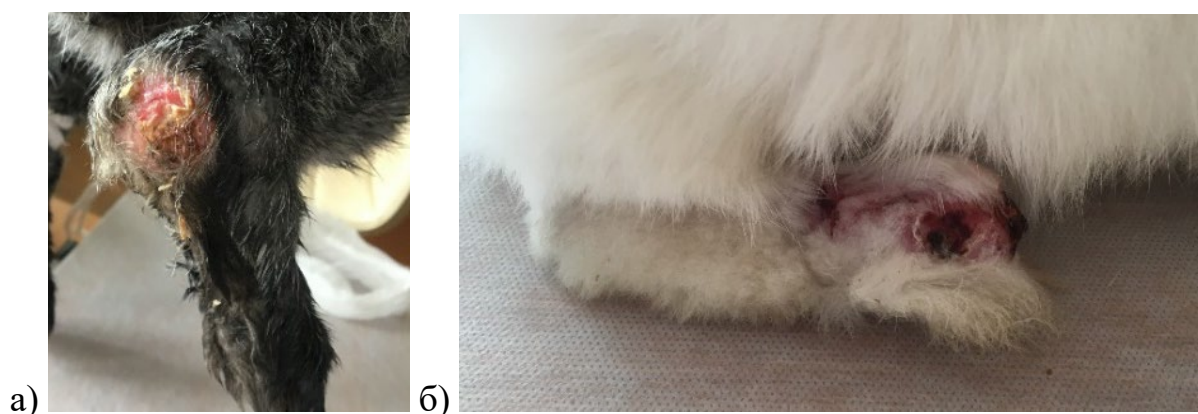



Рисунок 2.4 – Фото. Клінічні прояви денервації кінцівки тварин що спостерігались в експерименті: а) трофічна виразка спричинена денервацією шкірних покривів; б) ознаки аутофагії частин денервованої кінцівки.

З метою об'єктивізації та можливості підрахунку клінічних проявів денервації кінцівки нами було розроблено бальну систему оцінки ускладнень що виникли в експериментальних тварин після денервації кінцівки спричиненої перетином сідничного нерву (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Бальна система оцінки ускладнень що виникли в наслідок денервації кінцівки.

Критерій	Бали	Типовий прояв ускладнення
1	2	3
Трофічна виразка на шкірі прооперованої кінцівки площею до 1 см <sup>2</sup>	1	 <p>Трофічна виразка площею до 1 см<sup>2</sup>.</p>
Трофічна виразка більше 1 см <sup>2</sup> , або ознаки аутофагії частин кінцівки	2	 <p>Ознаки аутофагії передніх відділів стопи денервованої кінцівки.</p>
Невірно консолідований перелом кісток гомілки	3	 <p>На КТ-реконструкції визначається неправильне зрощення кісток правої гомілки зі значними осьовими та ротаційними порушеннями.</p>



1	2	3
Несправжній суглоб кісток	4	 <p>Ознаки неправжнього суглоба кісток правої гомілки.</p>

### 2.3. Електронейроміографічне дослідження

Електронейроміографію проводили безпосередньо перед виведенням тварин з експерименту. Виконували фіксацію тварини на спеціалізованому столику без застосування препаратів для анестезії чи седації. Електронейроміографічне дослідження виконували на електроміографі «Viking Quest» (виробництва США) шляхом проведення голкової електроміографії (ЕМГ) скелетних м'язів гомілки (*m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior*) та стимуляції активних рухів у м'язах тазових кінцівок шляхом активного зовнішнього механічного подразнення (рис. 2.5). Голкову електроміографію виконували в три етапи:

- 1 етап – проводили реєстрацію активності введення голкового електрода в цільовий м'яз. Введення голкового електрода спричиняє механічне подразнення м'язових волокон та викликає електричну активність, яка закінчується при припиненні переміщення електрода.
- 2 етап – дослідження цільового м'яза у спокої. При денервації у м'язах реєструють спонтанну денерваційну активність м'язових волокон у вигляді потенціалів фібриляцій (морфологічним субстратом якої є утворення власних синапсів між термінальними шваннівськими клітинами та постсинапсами міоцитів) та позитивних гострих хвиль (що відповідає руйнуванню міоцитів та вивільненню великої кількості іонів кальцію).
- 3 етап – дослідження цільового м'яза при довільному скороченні (у випадку з експериментальними тваринами – як реакція на зовнішнє механічне

подразнення). При цьому у м'язах реєстрували електричні потенціали, котрі генеруються руховими одиницями (рухова одиниця поєднує в одну анатомо-функціональну систему мотонейрон, аксон, нервово-м'язові синапси та м'язові волокна, які іннервує цей аксон та його терміналі). За допомогою голкової електроміографії у цільових м'язах визначали загальну кількість потенціалів рухових одиниць (ПРО) а також наступні параметри: тривалість, поліфазність та амплітуду потенціалів рухових одиниць.



Рисунок 2.5 – Фото. Методика проведення електронейроміографічного дослідження експериментальним тваринам.

Тривалість потенціалів рухових одиниць відображає їх територію, тобто кількість м'язових волокон в товщі скелетного м'язу, які були реіннервовані одним аксоном та їх просторовий розподіл у руховій одиниці, а також синхронність активації м'язових волокон досліджуваної рухової одиниці.

Амплітуда потенціалів рухових одиниць – відображає кількість, діаметр та щільність розподілу реіннервованих м'язових волокон по відношенню до електроду яким відбувається реєстрація потенціалу рухової одиниці.

Поліфазність потенціалу рухової одиниці – відображає синхронність формування потенціалів дії реіннервованих м'язових волокон, а також проведення імпульсів по нервовим та м'язовим волокнам. У фазі реінервації денерваційно-реіннерваційного процесу – збільшується кількість поліфазних потенціалів рухових одиниць (відсоток поліфазності), що характеризує позитивну динаміку відновлення.

#### **2.4. Рентгенологічне дослідження за даними комп'ютерної томографії**

Рентгенологічне дослідження з використанням комп'ютерної томографії (рис. 2.6) виконували безпосередньо перед виведенням тварин з експерименту. Проводили фіксацію тварини на спеціалізованому столику без застосування препаратів для анестезії чи седації, та за необхідності додаткову фіксацію спеціалізованими подушками. Комп'ютерна томографія виконувалась на апараті Philips Brilliance 16.



Рисунок 2.6 – Фото. Методика проведення рентгенологічного дослідження з використанням комп'ютерної томографії

Робота з DICOM зображеннями та відповідні розрахунки проводились у програмі RadiAnt DICOM Viewer версії 2020.2.3 (64-bit).

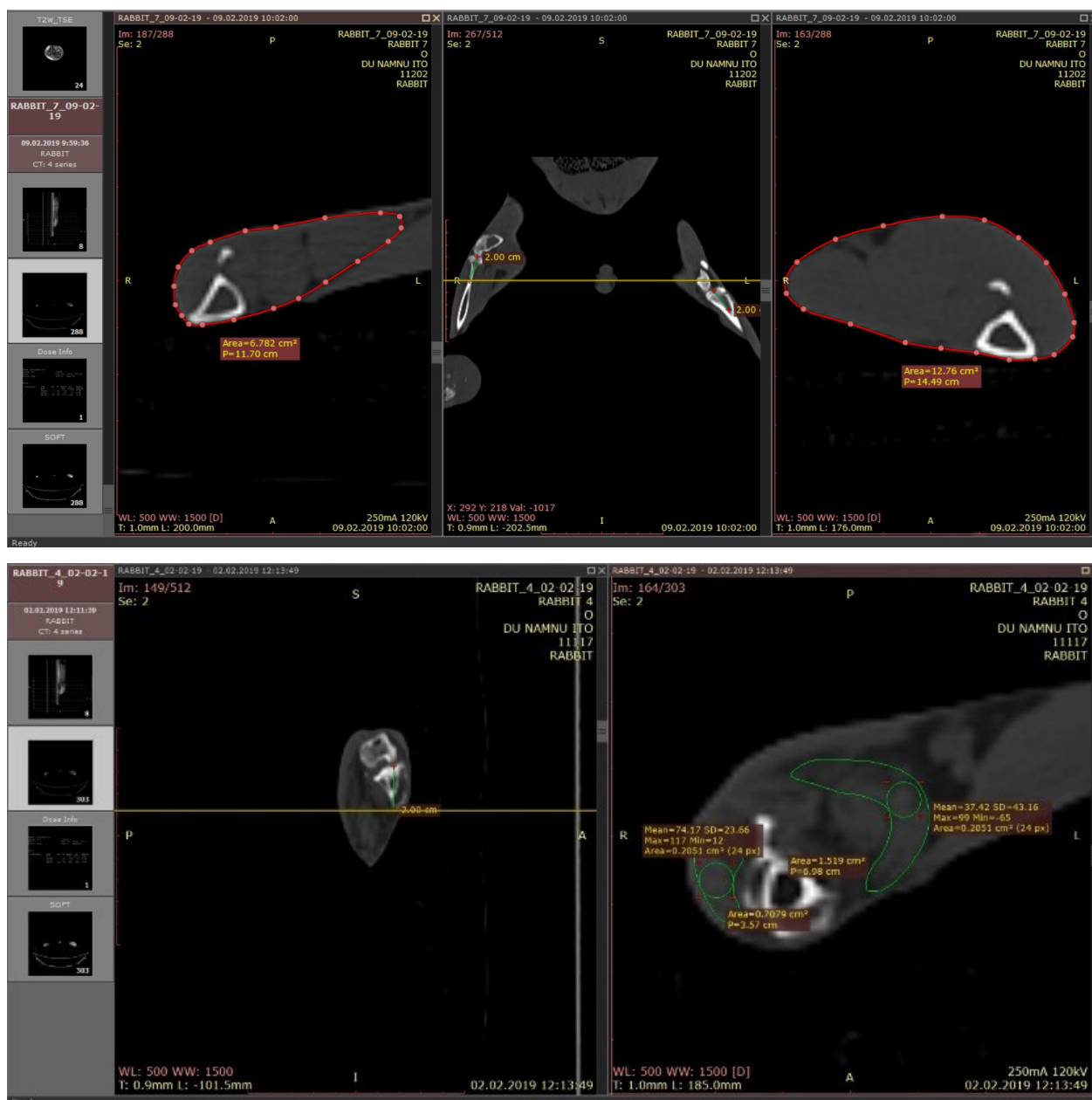


Рисунок 2.7 – Методика проведення розрахунків по КТ-зрізам

При дослідженні КТ-зрізів (рис. 2.7) розрахунки виконували на аксіальних зрізах на 2 см дистальніше суглобової щілини колінного суглоба. Виявлення гіпотрофії чи набряку гомілки виконували шляхом визначення відсоткового співвідношення окружності гомілки прооперованої та інтактної кінцівок. Визначення окружності гомілки проводилось на КТ сканах тазових кінцівок експериментальних тварин. Для розрахунків вираженості гіпотрофії кінцівки проводили вимірювання окружності оперованої кінцівки (справа) та інтактної

(зліва). Після чого визначали відсоткове співвідношення прооперованої кінцівки до інтактної (окружність якої було прийнято за 100%), і тим самим визначали рівень гіпотрофії. Для розрахунків вираженості гіпотрофії цільових м'язів проводили вимірювання площі перерізу *m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior* справа (оперована кінцівка) та зліва (інтактна кінцівка). Для розрахунків середньої рентгенологічної щільності м'язів проводили вимірювання рентгенологічної щільності в колі площею 0,2 см<sup>2</sup> розташованого в центрі *m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior* справа (оперована кінцівка) та зліва (інтактна кінцівка).

Окрім того за даними комп'ютерної томографії проводилось визначення наявності переломів кісток гомілки чи стопи денервованої кінцівки, та таких ускладнень як неправильна консолидація перелому, чи наявність хибного суглоба кісток гомілки.

## 2.5. Дослідження за даними магнітно-резонансної томографії



Рисунок 2.8 – Фото. Методика проведення дослідження з використанням магнітно-резонансної томографії



Дослідження з використанням магнітно-резонансної томографії (рис. 2.8) виконували безпосередньо перед виведенням тварин з експерименту. Проводили фіксацію тварини на спеціалізованому столику без застосування препаратів для анестезії чи седатії, та за необхідності додаткову фіксацію спеціалізованими подушками. Магнітно-резонансна томографія виконувалась на апараті Philips Achieva 1.5 тесла (виробництво Нідерланди).

Робота з DICOM зображеннями та відповідні розрахунки проводились у програмі RadiAnt DICOM Viewer версії 2020.2.3 (64-bit).

При дослідженні МР-зрізів (рис. 2.9) розрахунки виконували на аксіальних зрізах на 2 см дистальніше суглобової щілини колінного суглоба. Для розрахунків середньої вираженості МР-сигналу в режимах T1 і T2 цільових м'язів проводили вимірювання в колі площею 0,2 см<sup>2</sup> розташованого в центрі m.gastrocnemius, та m.tibialis anterior справа (оперована кінцівка) та зліва (інтактна кінцівка).



Рисунок 2.9 – Методика проведення розрахунків по МР-зрізам

## 2.6. Методика гістологічного дослідження

Скелетні м'язи (m.gastrocnemius, та m.tibialis anterior) фіксували у 10%-розчині формаліну, розведеному на фосфатному буфері (pH 7,4). Термін фіксації

складав 24 години, при температурі 4°C. Фрагменти м'язів для дослідження промивали від формаліну, виконували їх зневоднення у ізопропанолі (від 70% до 99,8%) та заключали у парафін (Leica Surgipath Paraplast Regular, Formula 'R', Німеччина). З фрагментів м'язової тканини, ущільнених у парафіні, виготовляли зрізи товщиною 8 мкм на мікротомі Thermo Microm HM 360 (Thermo Fisher Scientific, USA). Депарафіновані зрізи фарбували протягом 30 хв при 25°C сіріусом червоним (0,5 г Direct Red 80 (Magnacol Ltd, UK) у 500 мл насиченого розчину пікринової кислоти), після зневоднення, виконували розміщення на синтетичному середовищі (Merck, Німеччина). Мікропрепарати вивчали на мікроскопі Olympus BX51 (Olympus Corporation, Japan).

Зразки сідничного нерву довжиною 7-8 см які було відібрано для гістологічного дослідження фіксували у 10%-розчині нейтрального формаліну (розведення на фосфатному буфері (pH 7,4)). Після фіксації виділяли два фрагменти нерву: на рівні 0-0,5 см від зони мікрохірургічного шва і 5-6 см від зони мікрохірургічного шва. Кріозрізи отримували товщиною 15 мкм та проводили їх імпрегнацію азотнокислим сріблом для виявлення нервових волокон методом Коломійцева А.К. та Чайковського Ю.Б. та розміщали у синтетичному середовищі (Merck, Germany). Мікропрепарати досліджували на мікроскопі Olympus BX 51 (Olympus Corporation, Japan).

## **2.7. Методика електронної мікроскопії**

Електронну мікроскопію зразків цільових м'язів виконували всім експериментальним тваринам.

У 10%-розчині нейтрального формаліну виконували фіксацію скелетних м'язів (*m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior*). Зразки м'язів заморожували у мікротомі-кріостаті та одержували поздовжні зрізи товщиною 25-30 мкм. Для виявлення нервових волокон у м'язах використовували методику імпрегнації нітратом срібла.

Для дослідження ультраструктури м'язів зразки фіксували у 2,5% розчині глутаральдегіду у фосфатному буфері з наступною дофіксацією 1% OsO<sub>4</sub>, зневоднювали у етанолі та ацетоні, ущільнювали у епоксидній смолі (Epon 812, Araldite 502). Ультратонкі зрізи з епоксидних блоків одержували на ультратомі Reichert - Jung (Ultracut E, Німеччина). Зрізи фіксували на вольфрамових сітках і контрастували 2% розчином уранілацетату та цитратом свинцю. Зразки досліджували на скануючому електронному мікроскопі Tescan Mira 3 LMU (Чехія) у режимі трансмісійної мікроскопії (STEM).

## 2.8. Методика морфометричного дослідження

Кількість колагенових волокон (зони колагеногенезу) у цільових скелетних м'язах (*m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior*) оцінювали за допомогою морфометрії. Для цього на мікрофотографіях, котрі були виконані при малому збільшенні (збільшення об'єктива  $\times 10$ ), зроблено кластеризацію ділянок, відмінних за специфічним забарвленням. Мікропрепарати забарвлені пікросіріусом червоним містили ділянки із специфічною червоною реакцією до колагену, тоді як м'язові волокна були забарвлені у жовтий колір. Мікрофотографії гістологічних зрізів аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ (Wayne Rasband, США). Кількісний аналіз щільності розподілу колагену представлений у відсотках (%).

Для вимірювання діаметра м'язових волокон для кожного зразка випадковим чином відбирали 10-15 мікроскопічних полів, щоб дослідити щонайменше 200 волокон. Діаметр м'язових волокон вимірювали за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss AxioVision SE64 Rel.4.9.1 як лінійну проекцію між короткими кінцями одного волокна.

Морфометричний аналіз ділянок сідничного нерву полягав в оцінці щільності регенованих нервових волокон. Для морфометрії використано програмне забезпечення Carl Zeiss AxioVision SE64 Rel.4.9.1.



## 2.9. Біохімічне дослідження

Гомогенати зразків цільових м'язів (*m.gastrocnemius*, та *m.tibialis anterior*) отримували за допомогою електричного гомогенізатора Glas-Col (США). Для виготовлення гомогенату використовували 100 мг зразок досліджуваних цільових м'язів, 1 мл охолодженого 0,05 М фосфатного буфера, 0,1 мМ ЕДТА, з рН 7,6. Гомогенати центрифугували при 10000g протягом 20 хв для отримання супернатантів. Показники визначали за допомогою спектрофотометричного аналізу з використанням спектрофотометра  $\mu$ Quant, Bio-Tek, (США). Вимірювали рівень білка за методом Lowry О.Н.. Активність каталази визначали методом Aebi Н., супероксиддисмутази за методом Mirsa Н.Р. Активність глутатіонпероксидази вимірювали за зниженням рівнів НАДФН у кон'югованій глутатіонредуктазній реакції. Рівень активних продуктів тіобарбітуратової кислоти в гомогенатах цільових м'язів визначали за методом, описаним Uchiyama М.

### *Вимірювання рівню білку за методом Lowry О.Н.:*

Наведений метод заснований на можливості утворення забарвлених продуктів ароматичних амінокислот з комбінацією реактиву Фліна та біуретової реакції на пептидні зв'язки.

#### Реагенти:

- Реагент А – 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,10 N NaOH.
- Реагент В – 0,5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1% тартраті натрію або калію.
- Реагент С – лужний розчин міді. Виготовляється шляхом змішування 50 мл реагенту А з 1 мл реагенту В, після чого суміш відкладають на 1 день.
- Реагент D – карбонатно-мідний розчин, такий самий, як і реагент С, проте без додавання NaOH.
- Реагент Е – розведений реактив Фоліна. Проводили титрування фенолового реагенту Фоліна-Чокальтеу з NaOH до кінцевої точки фенолфталеїну. На основі цього титрування розводили реактив Фоліна (приблизно в 2 рази), щоб зробити його 1 N в кислоті.

- Робочі стандарти готували з людської сироватки, розведеної в 100-1000 разів (приблизно 700-70  $\mu$  на мл). Їх, у свою чергу, перевіряли зі стандартним розчином кристалічного бичачого альбуміну; 1  $\mu$  еквівалентний 0,97  $\mu$  сироваткового білка. Розведені розчини бичачого альбуміну не є задовільними для робочих стандартів через помітну тенденцію до денатурації поверхні.

Процедура для білків у розчині або легкорозчинних у розбавленому лугу (вказівки надано для кінцевого об'єму від 1,1 до 1,3 мл, але будь-яке кратне або частка наведених об'ємів може використовуватися за бажанням):

В 10 мл пробірці до зразка від 5 до 100  $\mu$  білку в 0,2 мл, додавали 1 мл реагенту С. Добре перемішували та давали постояти 10 хвилин при кімнатній температурі. Дуже швидко додавали 0,10 мл реагенту Е та змішували протягом двох секунд. Через 30 хвилин зразок зчитували у спектрофотометрі. Обчислювали за стандартною кривою та, якщо необхідно, вносили відповідну поправку на різницю між значенням кольору робочого стандарту та конкретних білків.

Нерозчинні білки:

У разі невеликої кількості білка, він розподілявся досить тонким шаром, та розчинявся приблизно через 3 години в 1 N NaOH при кімнатній температурі. Іноді додавали 0,1 мл 1 N NaOH до 5-100  $\mu$  осажденного білка. Через півгодини додавали 1 мл реагенту D (без NaOH), а потім через 10 хвилин 0,1 мл розведеного реактиву Фоліна реагенту Е.

Для більших зразків або дуже стійких осадів виконували їх нагрівання протягом 10 хвилин при 100° в 1 N лугу.

*Визначення активності каталази за методом Aebi H.:*

Метод полягає в руйнації субстрату  $H_2O_2$  каталазою, незруйнована частина пероксиду водню утворює з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс.

Реагенти:

- Фосфатний буфер 50 мМ, рН 7,0: виготовляли шляхом розчинення 6,81 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та 8,90 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  у дистильованій воді та доводили до 1000 мл кожен. Проводили змішування розчинів у співвідношенні 1:1,5.
- Перекис водню 30 мМ: виготовляли шляхом розведення 0,34 мл 30% перекису водню фосфатним буфером до 100 мл.

#### Вимірювання в тканинах:

Каталазу в тканинах визначали спектрофотометрично, досягаючи повного лізису усіх органел і отримуючи прозорі (або лише злегка забарвлені) розчини. Детергент (1% Triton X-100) використовували для приготування основного гомогенату (1 + 9 або 1 + 19). Подальші розведення виконували фосфатним буфером, рН 7,0. Каталазну активність виражали в мкмоль утилізованого перекису водню на 1 мг білку за 1 хв, та обчислювали за формулою:

$$A = k \cdot a / (0,0394 \cdot m)$$

Де:

A – Активність каталази

k – Константа експоненти

a – Оптична щільність перекису водню на початку реакції

m – концентрація білку в пробі (мг/мл)

0,0394 – коефіцієнт мілімолірної екстинції перекису водню.

#### *Визначення активності супероксиддисмутази за методом Mirsa H.P.:*

Активність супероксиддисмутази визначали за ступенем інгібування окислення адреналіну, та виражали в умовних одиницях з розрахунку на 1 мг білку за 1 хв. За одиницю активності супероксиддисмутази брали 50% інгібування окислення адреналіну. Визначення активності супероксиддисмутази проводили за формулою:

$$T = K_0 - K / K_0 \cdot 100\%$$

Де:

T – Відсоток інгібування реакції

K<sub>0</sub> – Зміна оптичної щільності за хвилину холостої проби

K – Зміна оптичної щільності за хвилину вимірюваної проби

*Визначення активності глутатіонпероксидази:*

Активність глутатіонпероксидази визначали шляхом визначення зменшення рівня НАДФН в сполученій глутатіонредуктазній реакції.

Інкубаційну суміш готували з: 0,05 М калій-фосфатного буфера (pH 7,6), 0,2 мМ відновленого глутатіону, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, 1 мМ ЕДТА, 0,075 мМ НАДФН, 0,04 одиниці глутатіонредуктази та 0,3 мг білка супернантата.

Реакцію розпочинали з додавання 0,2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В холосту пробу додавали аналогічний обсяг буферу. За оптичною щільністю стежили при довжині хвилі 340 нм протягом 5 хвилин. Оптичну щільність проб вносили в програмне забезпечення на комп'ютері та відповідно до їх різниці обчислювали константу регресії. Активність глутатіонпероксидази виражали в нмоль окисленого НАДФН на 1 мг білку за 1 хв, та обчислювали за формулою:

$$A = 1000 \cdot k / (6,22 \cdot m) (1,5)$$

Де:

k – коефіцієнт регресії

6,22 – коефіцієнт мілімолярного окислення НАДФН

m – концентрація білку в пробі (мг/мл)

*Вимірювання рівню активних продуктів тіобарбітуратової кислоти в гомогенатах за Uchiyama M.:*

Метод заснований на вивченні інтенсивності забарвлення, яке утворюється в наслідок реакції між малоновим діальдегідом та активних продуктів тіобарбітуратової кислоти в гомогенатах цільових м'язів, що проходить в кислому середовищі (рН близько 2,0) при високій температурі. До 0,5 мл 10% гомогенату цільових м'язів додавали 3 мл 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  і 1 мл 0,6% водного розчину тіобарбітуратової кислоти, суміш перемішували та нагрівали на киплячій водяній бані протягом 45 хвилин. Після охолодження суміші що утворилась, додавали 4 мл n-бутанолу, струшували та відокремлювали шар бутанолу методом центрифугуванням. Утворений в наслідок такої реакції триметіновий комплекс, містить одну молекулу малонового діальдегіду та дві молекули тіобарбітуратової кислоти, та має характерний спектр поглинання з максимумом при довжині хвилі від 520 нм до 535 нм що визначався спектрофотометричним методом. Оптичну щільність проб вносили у відповідне програмне забезпечення та обчислювали їх різницю.

## **2.10. Статистична обробка даних**

Статистичну обробку отриманих в результаті експерименту даних проводили з використанням програмного забезпечення OriginPro software ver. 8.0 (OriginLab Corporation, USA), StatPlus ver. 7.3.0. (AnalystSoft Inc., USA), та Microsoft Excel програмного пакету Microsoft Office Professional Plus 2016 (Microsoft Corporation, USA). Для опису досліджуваних параметрів були використані такі методи описової статистики: заходи центральної тенденції (середнє значення), діапазону, позитивної, негативної та середньої похибки. Визначення достовірності різниці між групами проводили за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Міжгрупову різницю також оцінювали за непараметричним критерієм Крускала-Уоліса. Нормальність розподілу вибірок даних проведено за критерієм Колмогорова-Смірнова. Міжгрупові різниці оцінювали за допомогою

однопараметричного дисперсійного аналізу варіацій ANOVA з поправкою Bonferroni. Різницю між групами вважали достовірною при  $P < 0,05$ . Результати представлені у вигляді таблиць та графіків.

### **2.11. Біоетика**

Дослідження було схвалено комісією з біоетики ДУ «Інститут травматології та ортопедії», протокол №1, від 19.06.2020 року. Члени комісії дійшли погодженої думки, що експериментальні маніпуляції проводили відповідно до правил “Regulations on the animal use of in research biomedical research”, “European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes”, та “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

## РОЗДІЛ 3

### КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ДЕНЕРВАЦІЇ КІНЦІВКИ

#### 3.1. Наукове підґрунтя до експериментального вивчення впливу аспірату кісткового мозку на скелетний м'яз в денерваційно-реіннерваційний період

В умовах сьогодення травми периферичних нервів кінцівок все ще залишаються потенційно інвалідизуючими, особливо у разі проксимальних чи застарілих уражень. Однією з основних причин при цьому є доволі швидка та прогресуюча атрофія м'язів дистальних сегментів верхньої або ж нижньої кінцівки що спричиняє їх патологічні, та не функціональні деформації. Проте навіть у разі своєчасної та якісно наданої хірургічної допомоги, за даними Wang (M. L. Wang et al.) та співавторів до 33% усіх травм периферичних нервів закінчуються неефективним відновленням. В той же час інші спеціалісти надають набагато більш песимістичні прогнози: Mackinnon та Dellon (Mackinnon and Dellon) зазначають що функціонального відновлення при травмах периферичних нервів верхньої кінцівки які потребують хірургічних втручань (а саме шва нерва, або аутонейропластики) вдалось досягти лише у 40% пацієнтів. Ruijs (Ruijs et al., "Median and Ulnar Nerve Injuries: A Meta-Analysis of Predictors of Motor and Sensory Recovery after Modern Microsurgical Nerve Repair") у своєму метааналізі літератури щодо ефективності хірургічного лікування ушкоджень периферичних нервів виявив що задовільної функції цільових м'язів вдається досягти лише у 51,6% випадків. В той же час зростання побутового травматизму, травматизму в наслідок дорожньо-транспортних пригод та військових дій – прогресивно збільшує кількість постраждалих з пошкодженнями периферичних нервів. Особливої уваги заслуговують пацієнти з вогнепальними пораненнями та політравмою, оскільки в цих випадках далеко не завжди можливо вчасно виконати хірургічне відновлення периферичного нерву, що в свою чергу буде призводити до заваження травм,

збільшення термінів денервації цільових м'язів а отже і погіршення результатів лікування.

Оскільки не завжди хірург може вчасно виконати оперативне втручання щодо відновлення ушкодженого периферичного нерву, або ж рівень ушкодження є таким що передбачає тривалий термін денервації цільових м'язів – виникає питання впливу на денервованій м'яз таким чином, щоб спробувати зберегти рівновагу між процесами регенерації та гіпотрофії, або ж сповільнити гіпотрофію цільових м'язів до моменту їх реіннервації.

Сьогодні технології регенеративної медицини перебувають в стадії активного розквіту, досліджень та впроваджень в практичну медицину оскільки мають значний ряд переваг (таких як аутологічність біологічного матеріалу, часто простоту у клінічному використанні) та здатність до активації власних регенераторних механізмів в тканинах. Проаналізувавши різноманітні підходи регенеративної медицини щодо впливу на денервованій скелетний м'яз ми вирішили зупинитись на клінічно найбільш простій та доступній технології – а саме використання аутологічного аспірату червоного кісткового мозку.

Ряд експериментальних досліджень вказує, що стромальні стовбурові клітини червоного кісткового мозку мають здатність до диференціації в сателітні клітини міоцитів потрапивши у відповідне середовище, окрім того фактори росту, що також присутні в аспіраті червоного кісткового мозку, мають здатність до стимулювання васкуляризації тканин шляхом активації неоангіогенезу. А як відомо, гіпотрофія скелетного м'язу також супроводжується перебудовою його мікроциркуляторного русла, та призводить до зменшення кількості капілярів на площу поперечного перерізу скелетного м'язу. Hogendoorn (Hogendoorn et al.) та співавтори в 2014 році опублікували результати клінічного дослідження впливу аспірату червоного кісткового мозку на денервованій м'яз у пацієнтів з травматичними ураженням плечового сплетення, де визначили потенційну здатність стовбурових клітин кісткового мозку диференціюватись у сателітні клітини міоцитів *in vivo*.



На сьогодні в практиці ортопеда-травматолога широко використовуються здобутки регенеративної медицини – секреторні білки, фактори росту, мезенхімальні стовбурові клітини з метою покращення регенерації та репарації кісткової тканини, а також у разі дегенеративних уражень м'яких тканин. Поряд з цим, вивчення застосування технологій регенеративної медицини на регенеративні та денерваційно-реіннерваційні процеси в скелетних м'язах, у більшості своїй, мають суто експериментальний характер. Поміж технологій регенеративної медицини які активно використовуються в клінічній практиці, зокрема у пластичній, спортивній, щелепно-лицьовій хірургії – широкого застосування отримав аспірат мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку. Значна кількість експериментальних робіт продемонстрували позитивний вплив клітинної терапії на нервову тканину та м'язи серця, причому при застосуванні цих препаратів не відзначають імунної реакції, як місцевого так і гуморального імунітету.

У випадках денерваційних змін та гіпотрофії м'язової тканини, все більше уваги приділяють застосуванню аутологічного аспірату клітин червоного кісткового мозку, що обумовлено їх здатністю до диференціювання по кільком лініям одночасно, зокрема у сателітні клітини міоцитів що є основним джерелом відновлення кількості ядер чи утворення нових міоцитів, та ендотеліоцити які в свою чергу сприяють неоангіогенезу. Проте з іншого боку, таке мультилінійне диференціювання мезенхімальних клітин може стати причиною розвитку хромосомних аберацій, та мутацій зазначених клітин, що підвищує ризики їх використання в онкологічному сенсі. Саме тому за мету нашого дослідження ми обрали можливість самостійно дослідити вплив аутологічного аспірату червоного кісткового мозку на регенераторний потенціал та швидкість гіпотрофічних змін скелетних м'язів та їх опосередковану дію на відновлений периферичний нерв у денерваційно-реіннерваційний період. Для подальшого гістологічного дослідження було обрано анатомічні структури заднього футляру гомілки та сідничний нерв в місці його ушкодження та відновлення. Гістологічні дослідження дали змогу

оцінити масштаби та рівень гіпотрофічних і атрофічних змін у денервованих скелетних м'язах. З метою демонстрації механізмів гіпотрофії при денервації та протидії їй проводили біохімічне дослідження цільових м'язів у денерваційно-реіннерваційний період, для розкриття метаболічних механізмів денерваційного ураження та впливу на нього аспірату червоного кісткового мозку.

Важливою проблемою, яка виникає при лікуванні пацієнтів з травмами периферичних нервів, є прогнозування перебігу гіпотрофії цільових м'язів, та розвиток супутніх трофічних порушень що пов'язані з денервацією. На прогноз впливають як безпосередні наслідки ушкодження периферичного нерву, так і динаміка гіпотрофічних та некротичних змін у цільових м'язах кінцівок. Тому питання методів визначення характеру динаміки патологічних процесів в скелетних м'язах є надзвичайно важливим. Аналіз існуючої літератури дозволив виявити декілька робіт присвячених дослідженню проявів денервації та реіннервації скелетних м'язів клінічно, та за допомогою сучасних методів голкової електронейроміографії, комп'ютерної і магнітно-резонансної томографії. На нашу думку використання методик цифрової обробки інформації може відкрити нові можливості у прогнозуванні перебігу гіпотрофії цільових м'язів. У нашій експериментальній роботі ми спробували оцінити ступінь ураження скелетних м'язів кінцівки в наслідок денерваційного процесу та за умов використання аутологічного аспірату кісткового мозку.

З метою стандартизації дослідження та отримання кількісних показників денерваційного та регенеративного процесів, першочергово нами було досліджено макроскопічні, клінічні прояви денервації, нейрофізіологічні процеси під час денерваційно-реіннерваційного періоду, та вираженість рентгенологічних змін за даними комп'ютерної томографії та МРТ, а в подальшому визначення гістологічних, ультраструктурних та біохімічних змін інтактних та уражених м'язів кінцівки.

### 3.2. Дослідження клінічних проявів денервації кінцівки тварин на різних етапах денерваційно-реіннерваційного процесу

З метою вивчення різних клінічних проявів денервації кінцівки (а саме наявність трофічних виразок, ознак аутофагії сегментів кінцівки, переломів та незрощень кісток гомілки) експериментальних тварин на ранньому та пізньому етапах денерваційно-реіннерваційного процесу було проведено реєстрацію відповідних ознак серед всіх груп експериментальних тварин. Дані проведених вимірювань, а саме: результат вимірювання відсоткового співвідношення гіпотрофії прооперованої та інтактної (здорової) гомілки за даними комп'ютерної томографії, та кількість балів ускладнень які розвинулись як наслідок денерваційного ураження кінцівки представлені у таблицях 3.1 та 3.2 відповідно. Показники отримані в контрольній групі (де виконували лише хірургічний доступ та мобілізацію сідничного нерву) не відрізнялись від показників не оперованих кінцівок.

Таблиця 3.1 – Результати вимірювання відсоткового співвідношення гіпотрофії цільових м'язів в дослідних групах тварин. Гіпотрофія вимірювалась у відсотках до здорової кінцівки.

	8 тижнів	12 тижнів	16 тижнів	Середній % гіпотрофії
	% гіпотрофії	% гіпотрофії	% гіпотрофії	
1	2	3	4	5
1 група	80,91	80,20	69,06	75,56
	58,73	98,47	79,32	
	57,04	82,37	73,91	
2 група	44,70	60,40	74,06	67,21
	53,51	90,43	74,24	
	78,85	54,90	73,84	

1	2	3	4	5
3 група	53,15	54,58	71,58	65,91
	51,22	73,15	69,76	
	61,16	87,96	70,64	
Середній % гіпотрофії	59,92	75,83	72,93	69,56

Таким чином, як видно з таблиці 3.1, гіпотрофія м'язів після денервації прогресивно наростала, а найбільший середній відсоток гіпотрофії цільових м'язів гомілки кролика спостерігався в термін 12 тижнів, та в подальшому дещо зменшувався, що є свідченням реіннервації м'язів.

Відповідно до розподілу за групами – найбільший середній відсоток гіпотрофії цільових м'язів спостерігався в 1 групі експериментальних тварин, тобто в тій групі де не виконували введення аспірату червоного кісткового мозку, що може свідчити про позитивний вплив мезенхімальних клітин на зменшення вираженості гіпотрофічних змін в скелетних м'язах.

Задля більш наочного розуміння динаміки процесів гіпотрофії скелетних м'язів представимо отримані нами результати у вигляді діаграми (рис. 3.1).

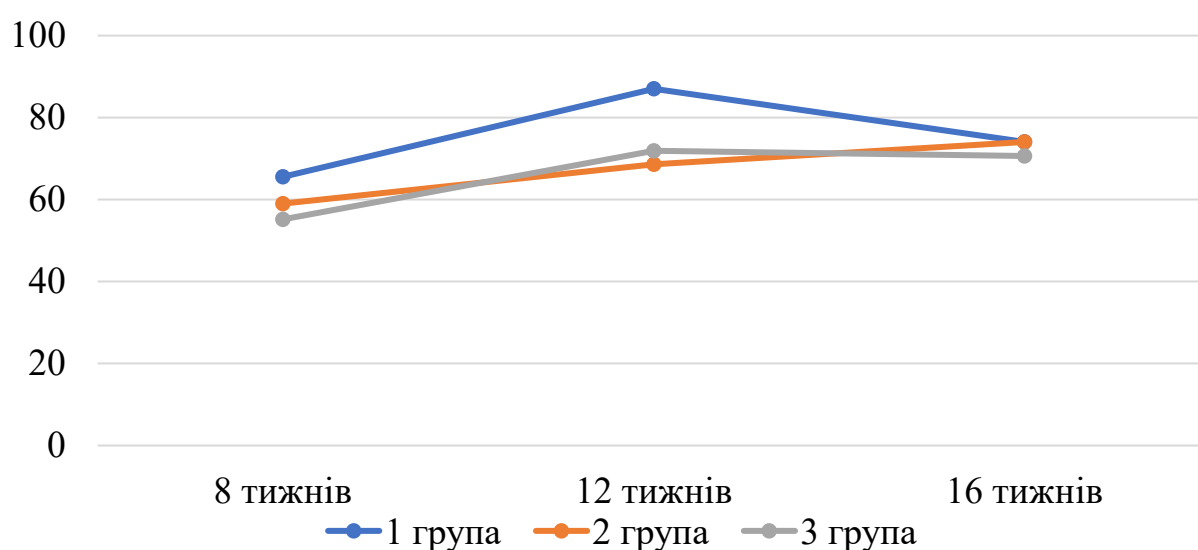


Рисунок 3.1 – Динаміка гіпотрофії м'язів гомілки в різних групах в наслідок ушкодження сідничного нерву.

Наведена діаграма дає краще розуміння динаміки перебігу процесів гіпотрофії цільових скелетних м'язів у групах експериментальних тварин в залежності від часу денерваційно-реінерваційного процесу.

Як видно з діаграми в першій групі (де не виконувалось введення аспірату червоного кісткового мозку) – визначається різке наростання гіпотрофії цільових м'язів протягом перших двох термінів, з подальшим зменшенням проявів гіпотрофії на третій термін експериментального дослідження (16 тижнів). Така динаміка перебігу процесів гіпотрофії та регенерації в м'язах гомілки відповідає природній динаміці у випадку ушкодження та хірургічного відновлення периферичного нерву.

В другій експериментальній групі (групі тварин якій виконували введення аспірату червоного кісткового мозку одразу під час хірургічного втручання з ушкодження та відновлення сідничного нерву) – динаміка гіпотрофії цільових м'язів гомілки є більш пологою та рівномірною, що може опосередковано свідчити про більш тривале збереження регенераторного потенціалу скелетних м'язів в цьому випадку. Одночасно з тим, в третьому терміні експерименту – показники другої та першої груп були схожі, тобто це в певній мірі підтверджує нашу теорію що введення аспірату червоного кісткового мозку може сповільнити прогресію гіпотрофії та подовжити терміни перебування скелетного м'яза в денервованому стані.

Крива вираженості гіпотрофії скелетних м'язів гомілки в третій експериментальній групі тварин (група де введення аспірату червоного кісткового мозку виконували через 7 тижнів після хірургічного втручання) демонструє плавне, проте більш виражене ніж в другій групі наростання проявів гіпотрофії, проте в подальшому навіть краще збереження об'єму цільових м'язів ніж в інших групах. Така динаміка процесу гіпотрофії та регенерації скелетних м'язів опосередковано свідчить про позитивний вплив аспірату червоного кісткового мозку.

Отже підсумовуючи аналіз даних отриманих на діаграмі динаміки проявів гіпотрофії цільових м'язів (рис. 3.1) можна зробити висновки про більш повільну

гіпотрофію скелетних м'язів у тварин другої та третьої експериментальних груп. А отже зробити припущення щодо позитивного впливу мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку на регенераторний потенціал скелетного м'язу в денерваційно-реіннерваційний період. Оскільки зазначене вище демонструє більш помірний перебіг гіпотрофії цільових скелетних м'язів гомілки протягом перших двох термінів експерименту, а також краще збереження об'єму м'язу в третій термін експериментального дослідження тобто вже в період його реіннервації.

Таблиця 3.2 – Результати підрахунку кількості балів ускладнень які розвинулись в наслідок денервації кінцівки у експериментальних тварин.

	8 тижнів	12 тижнів	16 тижнів	Загалом балів
	Бали ускладнень	Бали ускладнень	Бали ускладнень	
1 група	0	0	2	14
	1	3	1	
	4	2	1	
2 група	1	0	0	6
	0	1	1	
	1	0	2	
3 група	1	1	1	8
	0	2	0	
	1	1	1	
Загалом балів	9	10	9	28

Відповідно до даних наведених в таблиці 3.2, клінічні прояви денервації кінцівки розподілялись рівномірно та не значно залежали від термінів експерименту. В той же час кількість таких ускладнень як трофічні виразки і прояви аутофагії (рис. 3.2) елементів кінцівки, а також два найважчих ускладнення – перелом та незрощення кісток гомілки – в першій групі (групі експериментальних

тварин де не виконували введення аспірату червоного кісткового мозку) значно переважала дві інші групи.



Рисунок 3.2 – Клінічні прояви денервації кінцівки у вигляді трофічних виразок та ознак аутофагії елементів кінцівки.

Проводячи статистичний аналіз отриманих даних щодо клінічних проявів денервації кінцівки після ушкодження та хірургічного відновлення сідничного нерву – нами виявлено різницю з тенденцією до достовірності ( $p=0,07$ ) між балами клінічних проявів денервації та наявності ускладнень денерваційного процесу в першій та другій групах експериментальних тварин з більшою кількістю клінічних ускладнень в групі де не виконували введення мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку. Водночас, достовірної різниці чи тенденцій до достовірності між першою та третьою, а також другою та третьою групами експериментальних тварин виявлено не було.

При проведенні статистичного аналізу показників гіпотрофії скелетних м'язів (відсоткового співвідношення гіпотрофії прооперованої кінцівки до інтактної) – було визначено тенденцію до достовірності ( $p=0,08$ ) різниці в проявах гіпотрофії між першою та другою експериментальними групами. При статистичному аналізі проявів вираженості гіпотрофії між першою (де не виконували введення аспірату кісткового мозку) та третьою (де введення аспірату кісткового мозку виконували через 7 тижнів після первинного хірургічного

втручання) групами було виявлено достовірну різницю ( $p < 0,05$ ) з переважанням явищ гіпотрофії в першій групі. Дослідження статистичної різниці між групами де виконували введення аспірату кісткового мозку під час первинного хірургічного втручання (друга група), та групою де введення аспірату виконували на сьомому тижні (третя група) виявлено не було.

Згідно з даними рентгенологічних досліджень – гостра фаза денерваційного процесу в цільових скелетних м'язах при ураженні периферичних нервів проявляється вираженим набряком м'язової тканини (Sallomi et al.), а отже і більшим об'ємом зазначених цільових м'язів. Саме набряком і можна пояснити первинно більший об'єм цільових м'язів у дослідних тварин першої експериментальної групи у порівнянні з іншими групами (яким виконувалось введення мезенхімальних клітин кісткового мозку).

В той же час введення аутологічного аспірату червоного кісткового мозку в цільові м'язи проявлялось меншими проявами не лише клінічних денерваційних ускладнень (у другій та третій групах відзначалась менша частота розвитку трофічних виразок чи проявів аутофагії елементів кінцівок) але і меншим набряком цільових м'язів, що може опосередковано свідчити про позитивний трофічний вплив та покращення регенераторного потенціалу скелетного м'яза. Зменшення набряку при денервації може бути пов'язане з неоангіогенезом у денервованих скелетних м'язах після введення аспірату кісткового мозку та покращенням відтоку крові та міжклітинної рідини з нефункціонуючих м'язів.

Таким чином введення аспірату червоного кісткового мозку у цільові м'язи під час первинного оперативного втручання (нейротомії та нейрорафії сідничного нерва) та на ранніх етапах реіннервації (через 7 тижнів під первинного хірургічного втручання) – сприяло зменшенню клінічних ускладнень пов'язаних з денервацією кінцівки, таких як: набряк м'язів, наявність трофічних виразок, ознак аутофагії сегментів кінцівки, переломів та незрощень кісток гомілки. Після проведення статистичного аналізу, встановлено, що кількість ускладнень в групі де не виконували введення аспірату кісткового мозку – переважала, та мала певну



тенденцію до достовірності ( $p=0,07$ ). Введення аспірату червоного кісткового мозку в цільові м'язи на 7 тиждень після первинного хірургічного втручання, достовірно ( $p<0,05$ ) сприяло зменшенню набряку скелетних м'язів кінцівки та вираженості проявів гіпотрофії.

### **Публікації до розділу 3:**

Страфун, С.С., Лисак, А.С., Гузоватий, О.Ю. (2022). Вивчення в експерименті впливу введення аспірату кісткового мозку в денервованій м'яз (клінічні прояви денервації кінцівки). Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування, 113(2), 4-10. doi: 10.37647/0132-2486-2022-113-2-4-10.

## РОЗДІЛ 4

### ЕЛЕКТРОНЕЙРОМІОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Загальновідомим є той факт що перші ознаки денервації та реіннервації скелетного м'язу можна виявити шляхом проведення голкової електронейроміографії. Саме нейрофізіологічні показники дають нам можливість зрозуміти перебіг та стадію денерваційно-реіннерваційного процесу в цільовому м'язі. З метою вивчення процесів денервації та реіннервації нами досліджувались наступні нейрофізіологічні характеристики: спонтанна денерваційна активність скелетних м'язів а саме наявність та кількість потенціалів фібриляції і позитивних гострих хвиль методом «чотирьох квадрантів», кількість потенціалів рухових одиниць, тривалість потенціалів рухових одиниць, їх амплітуду, форму (кількість фаз у потенціалі рухової одиниці) та відсоток поліфазності.

Спонтанна денерваційна активність (рис. 4.1) характеризує електричну активність що виникає в скелетному м'язі після його денервації, та безпосередньо пов'язана з фізіологічними процесами які відбуваються в ньому. Так спонтанна денерваційна активність зазвичай характеризується трьома основними показниками: потенціали фібриляції, позитивні гострі хвилі та потенціали фасцикуляції, останні – пов'язані з ураженням мотонейрона та не були предметом нашого дослідження. Визначення спонтанної денерваційної активності проводять методом «чотирьох квадрантів» та реєструють у за бальною системою (від нуля до чотирьох). Обстежуваний м'яз умовно розділяють на чотири квадранти, голковий електрод вводять в скелетний м'яз та скеровують в напрямку одного з квадрантів, після чого проводять реєстрацію показників спонтанної денерваційної активності. У разі виявлення ознак спонтанної денерваційної активності в обстежуваному квадранті – її позначають як один бал, після чого голковий електрод виводять з квадранту (не виходячи при цьому зі скелетного м'язу), та скеровують в інший квадрант. Таким чином проводять реєстрацію у всіх чотирьох квадрантах. Відповідно до цього показники спонтанної денерваційної активності позначаються

від нуля (або абсолютно здоровий м'яз, або відсутність м'язової тканини) до чотирьох балів.

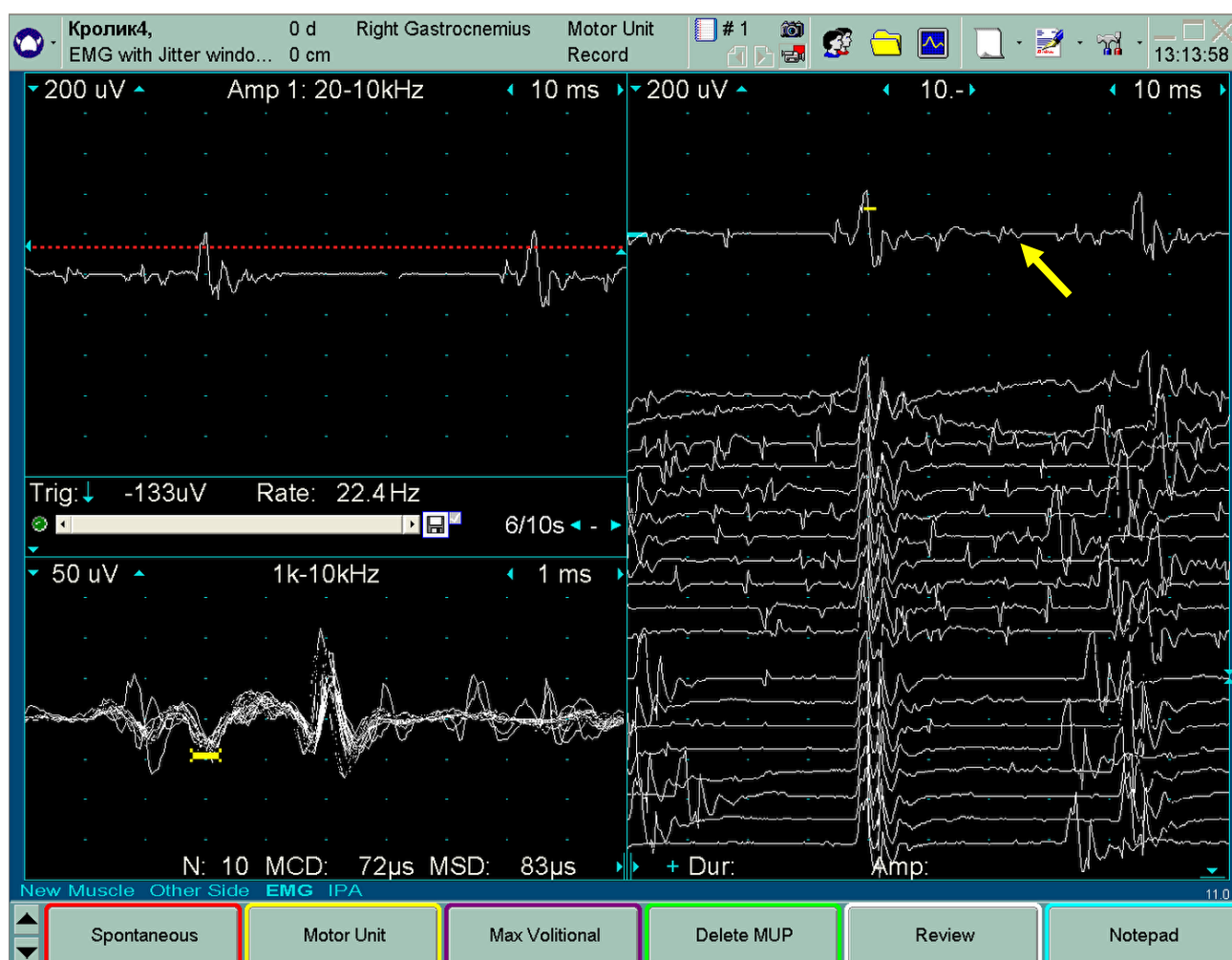


Рисунок 4.1 – Демонстрація спонтанної денерваційної активності у вигляді потенціалів фібриляцій (жовта стрілка).

Потенціали фібриляції характеризують утворення власних синапсів між термінальними Шваннівськими клітинами та постсинапсами міоцитів. Це відбувається як наслідок ушкодження аксону та реакції термінальної Шваннівської клітини на денервацію. У разі гострої фази денерваційного процесу потенціали фібриляції як правило реєструють у всіх чотирьох квадрантах. З часом їх кількість починає зменшуватись, що пов'язане або з початком реіннервації скелетного м'язу, або з процесами апоптозу чи міграції термінальних Шваннівських клітин, загибелі міоцитів та фіброзно-жирового заміщення скелетного м'язу.

Патофізіологічним субстратом виникнення позитивних гострих хвиль при денервації є загибель та розпад міоцитів, що спричиняє вивільнення в міжклітинний простір значної кількості іонів кальцію, які в свою чергу викликають швидке, тетаноподібне скорочення сусідніх міоцитів. З тривалістю денерваційного процесу кількість позитивних гострих хвиль починає прогресивно зростати, та у випадку хронічної, застарілої денервації – поступово зменшуватись що пов'язане зі зменшенням кількості міоцитів в м'язі.

Як ми бачимо з описаного вище – спонтанна денерваційна активність є природньою відповіддю скелетного м'язу на ушкодження периферичного нерву, проте різні її складові характеризують різні патофізіологічні процеси.

Потенціал рухової одиниці (рис. 4.2) – це біоелектричний потенціал що генерується однією руховою одиницею (рухова одиниця поєднує в одну анатомо-функціональну систему мотонейрон, аксон, нервово-м'язові синапси та м'язові волокна, які іннервує цей аксон та його терміналі). Поява потенціалів рухових одиниць при голковій електронейроміографії свідчить про початок реіннервації скелетного м'яза. Фізіологічним субстратом для появи потенціалів рухових одиниць є аксон що проріс до скелетного м'язу та почав реіннервувати його міоцити. Прогресивне збільшення кількості потенціалів рухових одиниць свідчить про позитивний перебіг реіннерваційного процесу. Для потенціалів рухових одиниць властивими є декілька характеристик які описують розповсюдження біоелектричного сигналу не лише по скелетному м'язу, але і по руховій одиниці в просторі по відношенню до голкового електроду що його реєструє. Основними характеристиками потенціалів рухових одиниць є: тривалість, амплітуда та форма (поліфазність).

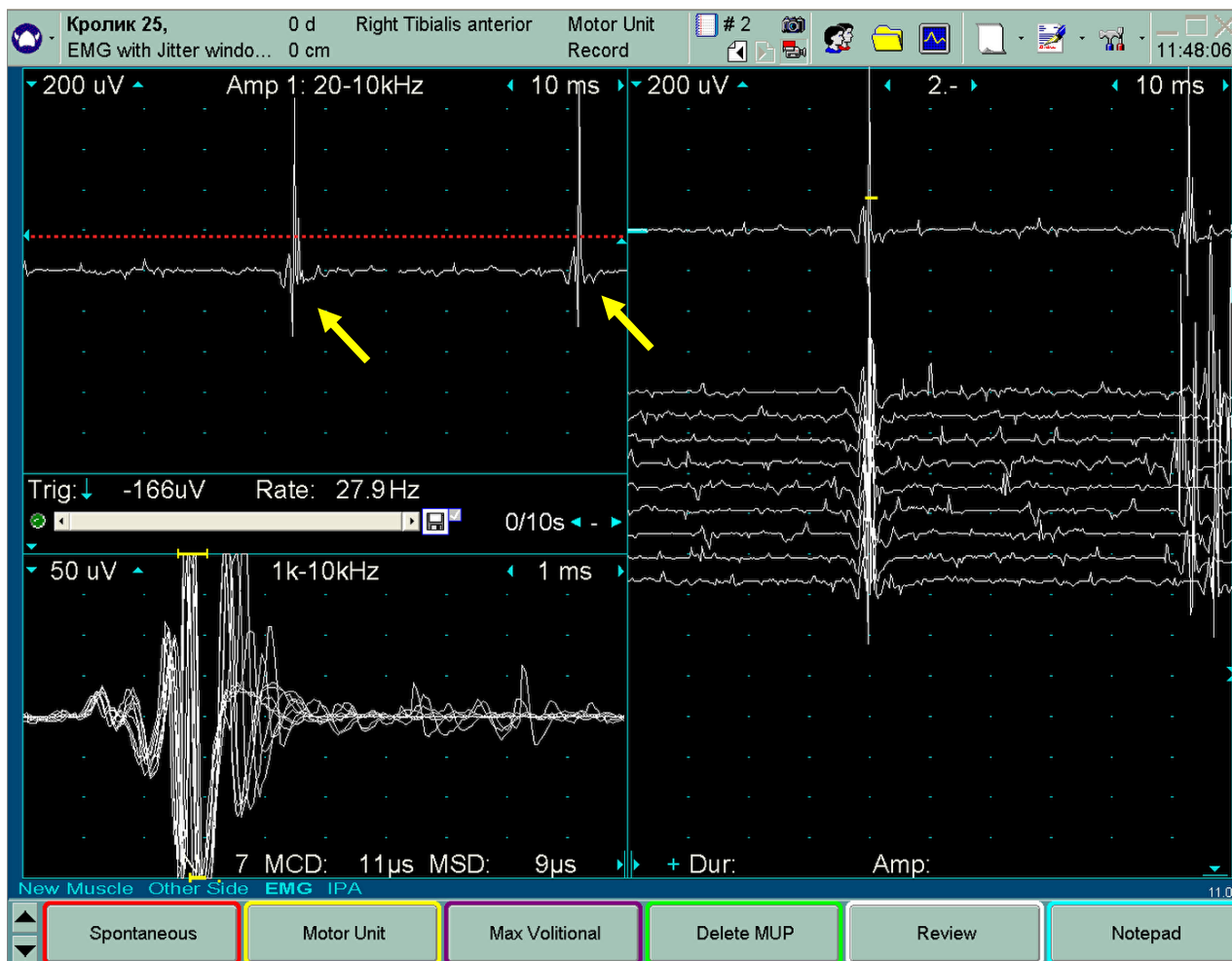


Рисунок 4.2 – Демонстрація потенціалів рухових одиниць (жовті стрілки) в цільових м'язах.

Тривалість потенціалу рухової одиниці це характеристика яка відображає територію рухової одиниці, тобто визначає яка кількість м'язових волокон були реіннервовані одним аксоном, їх просторовий розподіл у руховій одиниці, а також синхронність активації м'язових волокон досліджуваної рухової одиниці.

Амплітуда потенціалу рухової одиниці – це ознака яка залежить від кількості, діаметру та щільності розподілу реіннервованих м'язових волокон по відношенню до голкового електроду який його реєструє.

Форма потенціалу рухової одиниці, або кількість фаз у потенціалі рухової одиниці – це характеристика котра відображає синхронність формування потенціалів дії у реіннервованих м'язових волокнах та проведення біоелектричних імпульсів по нервовим та м'язовим волокнам рухової одиниці. Початок реіннервації

скелетного м'язу характеризується появою поліфазних, низькоамплітудних потенціалів рухових одиниць.

На початку реіннерваційного процесу – кількість фаз, та тривалість потенціалу рухової одиниці поступово та прогресивно зростає, що відповідає процесу термінального коллатерального спраутингу аксона. Дещо пізніше, по мірі того як аксон відновлює все більше м'язових волокон починає зростати і амплітуда потенціалу рухової одиниці. Після завершення процесу термінального коллатерального спраутингу, тобто коли аксон реіннервував максимально можливу кількість міоцитів починає відбуватись процес так званого «дозрівання» рухових одиниць. Цей процес в свою чергу характеризується зменшенням поліфазності, вирівнюванням форми потенціалу рухової одиниці, та зростанням її амплітуди.

Відповідно до дизайну експериментального дослідження голкова електронейроміографія проводилась піддослідним тваринам з метою визначення нейрофізіологічних характеристик перебігу денерваційно-реіннерваційного процесу в скелетних м'язах.

Під час другого етапу (дослідження цільового м'язу в стані спокою) електроміографічного дослідження проводили реєстрацію показників спонтанної денерваційної активності м'язових волокон в цільових м'язах. Показники вираженості спонтанної денерваційної активності в скелетних м'язах тварин дослідних груп не залежно від того виконувалось введення аспірату кісткового мозку чи ні (окрім контрольної групи) – суттєво не відрізнялись між собою. Перші терміни (8 ти 12 тижнів після хірургічного втручання) характеризувались значною кількістю потенціалів фібриляції, що дещо знижувалось в третій термін (16 тижнів) експериментального дослідження. Наявність поодиноких позитивних гострих хвиль визначалось протягом всього періоду експериментального дослідження у всіх дослідних групах.

Результати третього етапу голкової електронейроміографії цільових м'язів експериментальних тварин (реакція на зовнішнє механічне подразнення що спричиняло активне скорочення м'язів кінцівки) наведені в таблиці 4.1. За

показники норми були прийняті параметри потенціалів рухових одиниць, які реєструвались під час дослідження контрлатеральних (не оперованих) тазових кінцівок тварин.

Таблиця 4.1 – Результати третього етапу голкової електронейроміографії.

Термін	Група	Загальна кількість ПРО:	Кількість поліфазних ПРО:	Середня тривалість всіх ПРО: (мс)	Середня амплітуда всіх ПРО: ( $\mu V$ )
	Норма	$37 \pm 2,56$	$8 \pm 0,94$	$15,8 \pm 3,46$	$4382 \pm 2568,63$
8 тижнів	1 група	$8 \pm 0,94$	$5 \pm 0,90$	$8,4 \pm 8,93$	$223 \pm 297,16$
	2 група	$7 \pm 1,67$	$7 \pm 1,67$	$5,9 \pm 8,36$	$116 \pm 164,59$
	3 група	$15 \pm 1,26$	$8 \pm 1,60$	$9,1 \pm 7,42$	$294 \pm 329,24$
	Контрольна група	$53 \pm 3,08$	$22 \pm 1,37$	$14,6 \pm 3,60$	$2756 \pm 1262,38$
12 тижнів	1 група	$28 \pm 3,30$	$15 \pm 1,26$	$14,7 \pm 2,21$	$1439 \pm 1026,23$
	2 група	$43 \pm 1,46$	$18 \pm 1,29$	$16,6 \pm 2,97$	$864 \pm 143,52$
	3 група	$46 \pm 3,90$	$13 \pm 1,67$	$13,2 \pm 2,48$	$1372 \pm 602,49$
	Контрольна група	$46 \pm 1,70$	$13 \pm 1,46$	$15,3 \pm 2,67$	$3218 \pm 1458,79$
16 тижнів	1 група	$38 \pm 1,25$	$11 \pm 0,69$	$13,5 \pm 1,89$	$1307 \pm 606,50$
	2 група	$44 \pm 1,60$	$15 \pm 2,57$	$13,2 \pm 2,21$	$917 \pm 275,07$
	3 група	$51 \pm 2,50$	$12 \pm 1,29$	$12,1 \pm 1,52$	$1099 \pm 400,19$
	Контрольна група	$34 \pm 1,80$	$7 \pm 0,90$	$18,1 \pm 2,80$	$4526 \pm 2086,60$

Під час дослідження нами було виявлено також і зміни параметрів потенціалів рухових одиниць у цільових м'язах тварин контрольної групи (де виконувався лише хірургічний доступ та мобілізація сідничного нерву, без його

ушкодження). Подібні зміни, а саме поява поліфазних потенціалів рухових одиниць, нами було розцінено як асинхронність проведення нервового імпульсу по аксонам сідничного нерву. Це могло виникнути за рахунок ураження незначної кількості аксонів під час мобілізації нерву, або ж з розвитком локального порушення мікроциркуляції сідничного нерву і як наслідок фіброзування мезоневрію (параневральних тканин) та його ішемії. У віддаленому період (третій термін експериментального дослідження – 16 тижнів) після хірургічного втручання з мобілізації сідничного нерву, при дослідженні тварин контрольної групи, ми реєстрували показники що наближались до параметрів не оперованих кінцівок тварин.

Задля більш наочної демонстрації змін показників загальної кількості потенціалів рухових одиниць та відсоткового співвідношення поліфазних потенціалів рухових одиниць представимо отримані нами дані у вигляді діаграми (рис. 4.3).

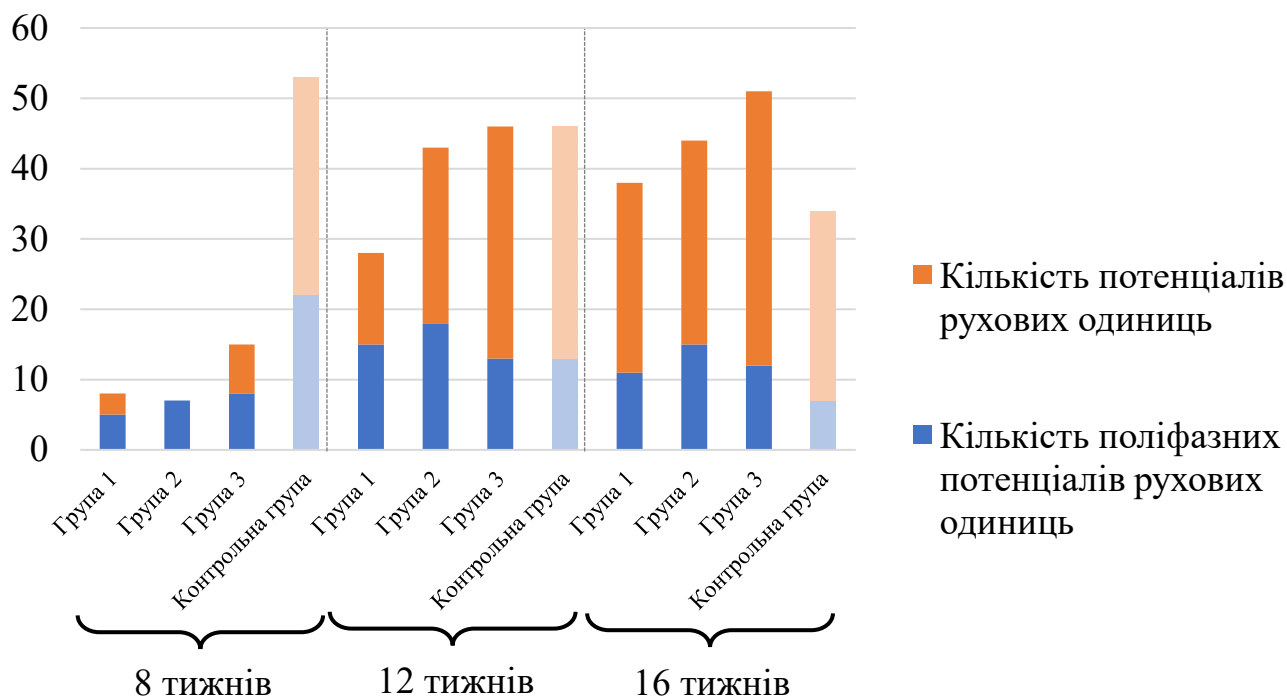


Рисунок 4.3 – Динаміка зростання кількості потенціалів рухових одиниць та змін відсоткового співвідношення між загальною кількістю та поліфазними



потенціалами рухових одиниць. Контрольна група виділена більш світлими кольорами з метою фокусу уваги саме на дослідних групах.

Проводячи аналіз нейрофізіологічних показників, що були отримані у перший термін експериментального дослідження (8 тижнів) після хірургічного втручання, у скелетних м'язах всіх тварин дослідних груп, відмічали загальну низьку кількість потенціалів рухових одиниць, що характеризуються малою тривалістю, амплітудою та значною поліфазністю. Подібні показники пояснюються початковими етапами реіннерваційних процесів у цільових м'язах (аксони тільки доросли до відповідних скелетних м'язів та почали їх відновлення). У другому терміні – 12 тижнів після оперативного втручання спостерігалось значне збільшення кількості потенціалів рухових одиниць, відсоток поліфазності серед яких був меншим за перший термін, окрім того спостерігалось рівномірне збільшення тривалості та амплітуди. Збільшення кількості потенціалів рухових одиниць продовжувалось і у третій термін експериментального дослідження – 16 тижнів. В цей період відсоток поліфазних потенціалів рухових одиниць у загальному співвідношенні продовжував зменшуватись, крім того вирівнювались показники тривалості та амплітуди рухових одиниць що свідчило про їх «дозрівання».

Провівши статистичний аналіз отриманих в ході експериментального дослідження нейрофізіологічних показників нами було визначено. Найбільша кількість потенціалів рухових одиниць на різних етапах денерваційно-реіннерваційного процесу була зареєстрована у другій та третій групах (групи де виконували введення аспірату кісткового мозку на різних етапах експерименту, у другій групі одразу під час первинного хірургічного втручання, у третій групі через 7 тижнів після денервації та відновлення сідничного нерву) та мала тенденцію до достовірності ( $p=0,07$ ) по відношенню до першої групи (де введення аспірату червоного кісткового мозку не виконувалось). Аналізуючи зареєстровані кількості потенціалів рухових одиниць можна відзначити наступне:

- Перша дослідна група (де виконували лише нейротомію та нейрорафію сідничного нерву) характеризувалась меншою кількістю зареєстрованих потенціалів рухових одиниць, з поступовою тенденцією до збільшення їх кількості зі збільшенням термінів експерименту. Проте кількість потенціалів рухових одиниць в цій групі у всіх періодах дослідження була найнижчою.

- Друга дослідна група (група експериментальних тварин яким виконували введення аспірату червоного кісткового мозку під час оперативного втручання) характеризувалась, порівняно з першою групою, відносно більшою кількістю потенціалів рухових одиниць. Причому в першому періоді (8 тижнів) кількість зареєстрованих потенціалів рухових одиниць була співрозмірна з першою групою, проте починаючи з другого терміну (12 тижнів) перевищувала її показники.

- Третя дослідна група (введення аспірату кісткового мозку виконували через 7 тижнів після хірургічного втручання з перетину та відновлення сідничного нерву) на всіх етапах експериментального дослідження визначалась найбільша кількість потенціалів рухових одиниць з тенденцією до достовірності ( $p=0,06$ ) різниці показників між групами. У термін 8 тижнів після хірургічного втручання кількість зареєстрованих потенціалів рухових одиниць практично вдвічі перевищувала показники першої та другої експериментальних груп, проте з дванадцятого тижня різниця у кількості потенціалів рухових одиниць між другою та третьою групами була незначною.

Аналізуючи зміни параметрів зареєстрованих потенціалів рухових одиниць, а саме поліфазності, тривалості та амплітуди – у всіх дослідних групах у різні терміни після хірургічного втручання співвідносились з відповідними стадіями денерваційно-реіннерваційного процесу. Так, нами спостерігалось рівномірне зростання тривалості, амплітуди та поліфазності потенціалів рухових одиниць в ранній період між восьмим та дванадцятим тижнями – що є притаманним для активного реіннерваційного процесу. Та поступове зменшення поліфазності, та тривалості з продовженням зростання амплітуди потенціалів рухових одиниць, що

відображало морфофункціональну перебудову рухових одиниць, притаманну пізнім стадіям реіннерваційного процесу.

Отже, проаналізувавши все вищезазначене можна припустити що введення аспірату червоного кісткового мозку у цільові м'язи під час хірургічного втручання з пошкодження та відновлення сідничного нерву, та на ранніх етапах реіннервації (в умовах зазначеного експериментального дослідження – це термін 7 тижнів після оперативного втручання) – сприяє покращенню реіннерваційних процесів у скелетних м'язах кінцівки, що проявляється реєстрацією більшої кількості потенціалів рухових одиниць, та має тенденцію до достовірності ( $p=0,07$ ). Введення клітинних препаратів суттєво не впливає на параметри (такі як тривалість, амплітуда та форма (поліфазність)) зареєстрованих потенціалів рухових одиниць. Зазначені зміни цих показників в усіх групах співвідносились з відповідними стадіями та етапами денерваційно-реіннерваційного процесу, та морфофункціональної перебудови (дозрівання) рухових одиниць.

#### **Публікації до розділу 4:**

Strafun, S., Gaiko, O., Halii, Y., Lysak, A. (2020). Study of bone marrow aspirate injection effect on denervated muscle according to electromyography studies. EUREKA: Health Sciences, (6), 24-30. doi: 10.21303/2504-5679.2020.001499.

## РОЗДІЛ 5

### КТ ТА МРТ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦІЛЬОВИХ М'ЯЗІВ

Сучасними, загальнодоступними неінвазивними методами діагностики і візуалізації травм та уражень тканин живих організмів є ультразвукове дослідження, рентгенографія, комп'ютерна та магнітно-резонансна томографії. Навіть сучасна електронна рентгенографія дозволяє отримати доволі опосередковані дані щодо стану м'яких тканин у разі ураження периферичних нервів. Ультрасонографія є простим, низько вартісним та доступним неінвазійним методом візуалізації м'яких тканин (Zhu et al.; Volk et al.). Сучасні апарати ультразвукової діагностики дозволяють з легкістю візуалізувати різні типи ушкодження периферичних нервів (анатомічний перерив, тракційне ураження, часткове ушкодження чи прояви нейропатії) та травму безпосередньо скелетних м'язів. В той же час визначення незначних змін структури скелетного м'язу при денерваційних процесах, особливо на ранній стадії денервації чи початку реіннервації цільового м'язу – можуть бути доволі складними для діагностики, та потребують значної стандартизації методу. На відміну від ультразвукової діагностики – комп'ютерна та магнітно-резонансна томографії (Stoll et al.; Connor et al.) дають можливість отримати більш об'єктивні характеристики зміни сигналу скелетного м'язу. Саме тому в якості основних неінвазивних методів візуалізації скелетних м'язів в експерименті було обрано ці методи дослідження. Зміна характеристик рентгенологічної щільності, і вираженості МР-сигналу цільових м'язів при різних програмах сканування, після ушкодження сідничного нерву та його відновлення – може опосередковано свідчити не лише про перебіг денерваційно-реіннерваційного процесу (Holl et al.), але і про якість самого відновлення нерву.

### **5.1. Дослідження змін у цільових м'язах методом комп'ютерної томографії**

Зазвичай, в ортопедо-травматологічній практиці комп'ютерна томографія використовується для діагностики та кращої візуалізації складних переломів чи незрощень, проте можливості методу виходять далеко за межі діагностики уражень кісток. Широке використання зазначеної діагностичної методики в усіх сферах, зокрема і для діагностики ураження м'яких тканин (активне застосування в онкології для виявлення необластичних процесів зокрема і в головному мозку, використання в абдомінальній хірургії і т.д.) звертає на себе увагу багатьох дослідників, як потенційний метод визначення порушень метаболізму в тканинах організму. Зокрема комп'ютерна томографія широко застосовується для оцінки рентгенологічної щільності різних тканин організму, що засновано на залежності між фізичною щільністю та ослабленням рентгенівських променів при проходженні через різні тканини організму, та виражених в одиницях Гаунсфілда (HU). Goodpaster зі співавторами (Goodpaster et al.) у своїх дослідженнях опублікованих в 2000 році продемонстрували відповідність значень середньої рентгенологічної щільності цільових м'язів за даними вимірювань комп'ютерної томографії з вмістом ліпідів у цих м'язах, який вимірювали біохімічним вилученням тригліцеридів. Точність такого вимірювання була вирахована в аналітичному дослідженні, що показало значну кореляцію між оцінкою середньої рентгенологічної щільності цільових м'язів, за даними комп'ютерної томографії, співвідношення «жирова/м'язова тканина» та вагою м'язової тканини під час патоморфологічного дослідження (van de Sande et al.).

Ми вирішили дослідити зміни рентгенологічної щільності цільових м'язів гомілки за даними комп'ютерної томографії в нашому експериментальному дослідженні після ушкодження та відновлення сідничного нерву, а також після введення аспірату червоного кісткового мозку одночасно з первинним хірургічним втручанням та у разі його введення через 7 тижнів після операції.

Результати середніх значень по групі та терміну експериментального дослідження отриманих нами вимірювань показників рентгенологічної щільності цільових м'язів (рис. 5.1) після аналізу проведених досліджень сканів комп'ютерної томографії експериментальних тварин представлені в таблиці 5.1. За показники нормальної площі поперечного перерізу та рентгенологічної щільності цільових м'язів було прийнято відповідні показники не оперованих, контрлатеральних тазових кінцівок тварин.

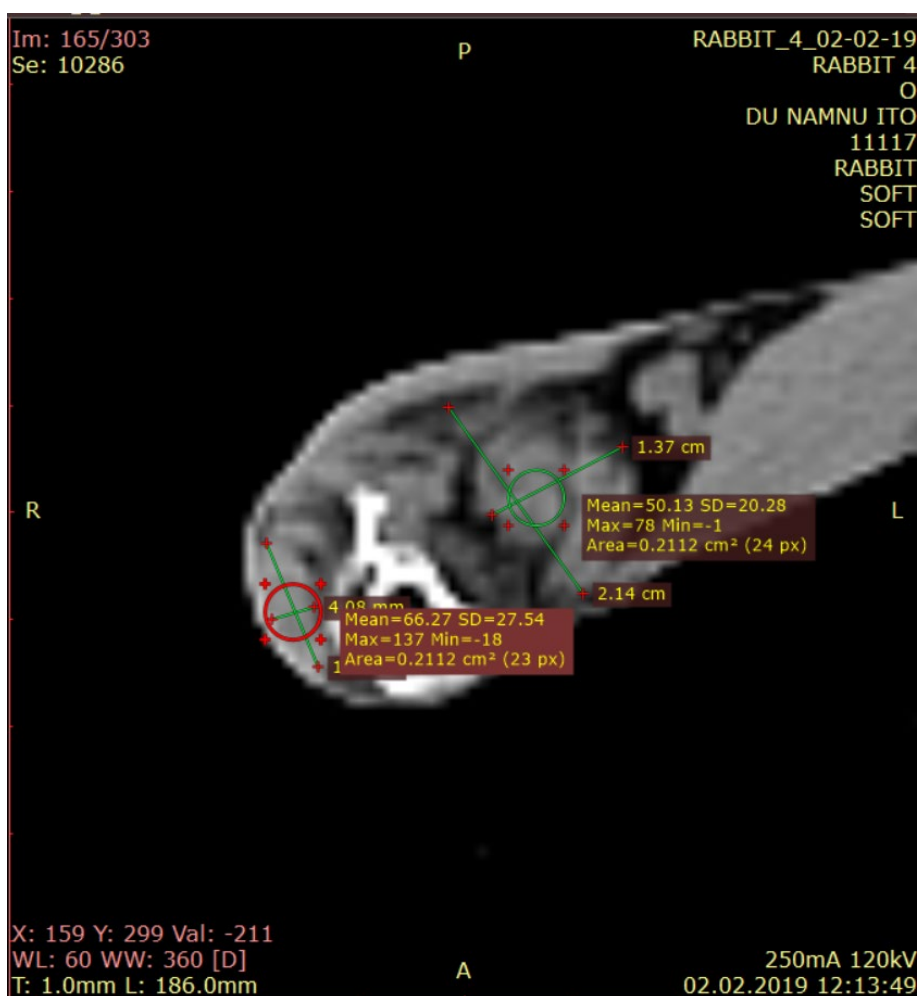


Рисунок 5.1 – Проведення розрахунків з вимірювання рентгенологічної щільності цільових м'язів.

Показники рентгенологічної щільності та площі поперечного перерізу цільових м'язів контрольної групи тварин (групи де виконували лише хірургічний доступ та мобілізацію сідничного нерву) не відрізнялись від показників норми.

Таблиця 5.1 – Результати вимірювань за даними комп'ютерної томографії цільових м'язів.

Термін	Група	Середня площа поперечного перерізу m.Tibialis anterior (см <sup>2</sup> )	Середня рентгенологічна щільність m.Tibialis anterior (HU)	Середня площа поперечного перерізу m.Gastrocnemius (см <sup>2</sup> )	Середня рентгенологічна щільність m.Gastrocnemius (HU)
Норма		1,2 ± 0,12	85,84 ± 6,91	4,1 ± 0,27	73,84 ± 5,48
8 тижнів	1 група	0,5 ± 0,11	71,98 ± 4,10	1,4 ± 0,15	53,25 ± 14,60
	2 група	0,5 ± 0,09	70,93 ± 2,84	1,5 ± 0,16	59,44 ± 8,58
	3 група	0,4 ± 0,06	77,26 ± 5,05	1,2 ± 0,28	61,88 ± 3,05
12 тижнів	1 група	0,6 ± 0,18	75,89 ± 16,55	2,5 ± 0,89	64,12 ± 9,56
	2 група	0,5 ± 0,20	84,62 ± 0,39	1,8 ± 0,44	74,11 ± 3,52
	3 група	0,5 ± 0,05	49,23 ± 10,23	1,7 ± 0,29	39,00 ± 15,70
16 тижнів	1 група	0,8 ± 0,03	74,78 ± 10,40	2,2 ± 0,29	66,44 ± 3,33
	2 група	0,8 ± 0,02	64,38 ± 13,39	2,4 ± 0,07	51,97 ± 5,99
	3 група	0,8 ± 0,20	71,75 ± 10,27	2,4 ± 0,29	71,99 ± 1,03

Як видно з наведеної таблиці в усіх групах експериментальних тварин не залежно від того чи проводилось введення аспірату кісткового мозку в цільові м'язи чи ні – визначається значне зменшення площі поперечного перерізу цільових м'язів. Що є більш вираженою в ранній період денерваційно-реіннерваційного процесу – 8 тижнів після перетину та відновлення сідничного нерву, та прогресивно,

рівномірно збільшується до третього періоду експериментального дослідження – 16 тижнів після хірургічного втручання.

З метою більш наочної демонстрації динаміки показників рентгенологічної щільності цільових м'язів представимо отримані нами дані у вигляді діаграм (рис. 5.2 та рис. 5.3).

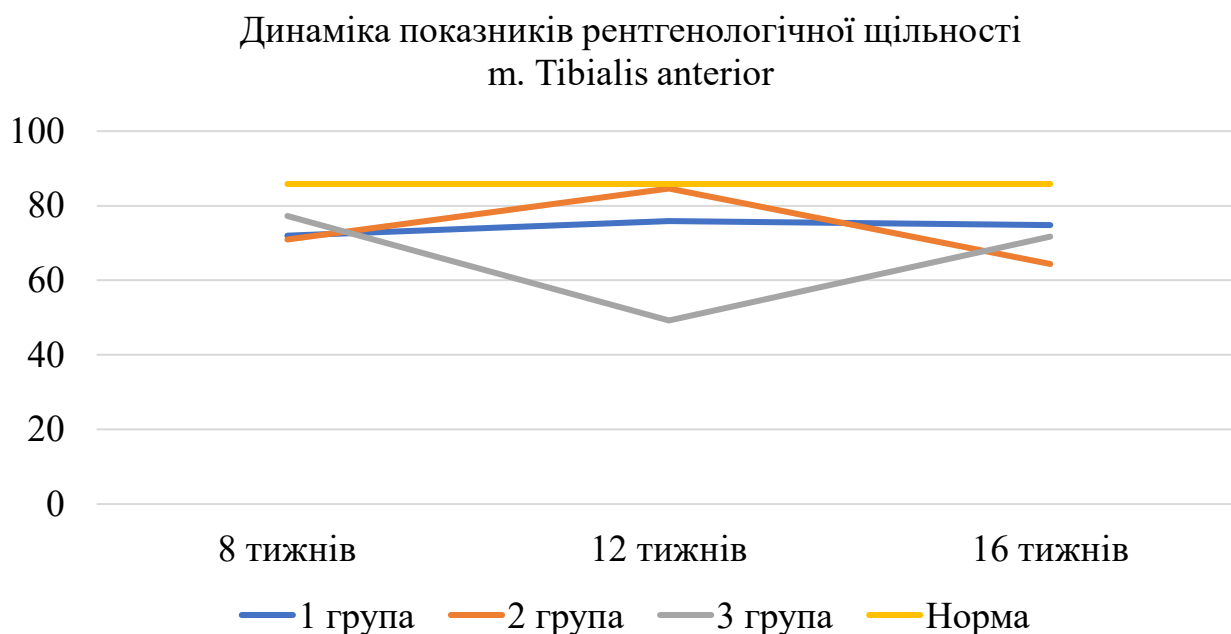


Рисунок 5.2 – Динаміка зміни рентгенологічної щільності показників m. Tibialis anterior.

Як видно з наведеної діаграми змін показників рентгенологічної щільності m. Tibialis anterior – рентгенологічна щільність відповідного м'язу в першій групі протягом всього періоду експериментального дослідження була нижчою за норму, що може відповідати набряку м'язу в період його денервації. В другій групі (де введення аспірату кісткового мозку виконували одночасно з хірургічним втручанням) в термін 12 тижнів рентгенологічна щільність відповідного м'язу відповідає показникам норми, проте в третьому терміні, 16 тижнів, починає зменшуватись. На нашу думку це може бути пов'язано з процесами регенерації та ущільнення м'язової тканини, та подальшим збільшенням набряку м'язу в ранній період функціонального відновлення м'язу (збільшення фізичних навантажень на



м'яз). Показники третьої групи (де введення аспірату кісткового мозку виконували у віддалений період – через 7 тижнів після хірургічного втручання) – навпаки, протилежні другій, та в період 12 тижнів спостерігається зменшення рентгенологічної щільності досліджуваного м'яза, а в період 16 тижнів після хірургічного втручання – її зростання. Це, на нашу думку, може бути пов'язане з віддаленим введенням аспірату червоного кісткового мозку та активними процесами неоангіогенезу у м'язі що досліджується.

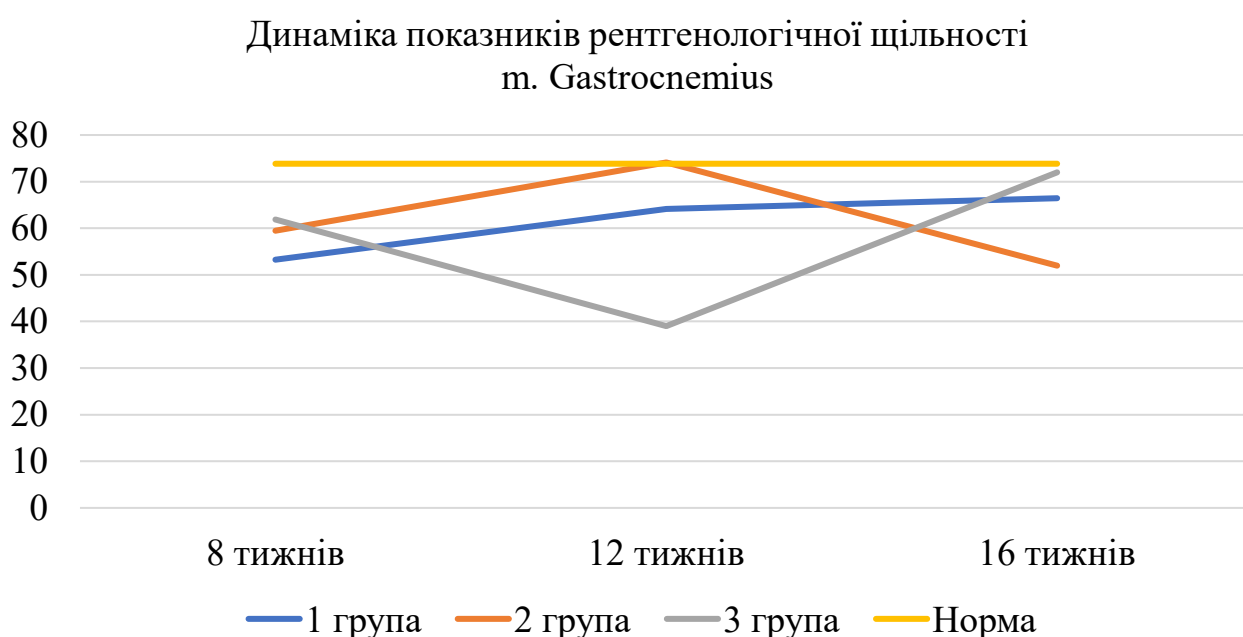


Рисунок 5.3 – Динаміка зміни рентгенологічної щільності показників m. Gastrocnemius.

Наведена вище діаграма змін показників рентгенологічної щільності m. Gastrocnemius в усіх трьох групах відповідає таким для m. Tibialis anterior.

Проводячи статистичний аналіз отриманих під час комп'ютерної томографії даних – нами була виявлена достовірна різниця ( $p < 0,05$ ) рентгенологічної щільності поміж досліджуваних цільових м'язів оперованої та не оперованої кінцівки, зі зменшенням рентгенологічної щільності м'язів оперованої кінцівки, що пояснюється набряком денервованого м'язу та процесами неоангіогенезу викликаними введенням аспірату кісткового мозку. Крім того було визначено

різницю з тенденцією до достовірності ( $p=0,08$ ) між площами поперечного перерізу цільових м'язів оперованої та не оперованої кінцівки, з більшою площею поперечного перерізу цільових м'язів не оперованої кінцівки.

Проводячи порівняння середніх показників рентгенологічної щільності і площі поперечного перерізу визначених цільових м'язів між дослідними групами – достовірної різниці виявлено не було. Попри те відмічали більшу загальну площу поперечного перерізу цільових м'язів експериментальних тварин другої дослідної групи (медіана площі поперечного перерізу цільових м'язів становила –  $1,15 \text{ см}^2$ ), дещо нижчим був показник площі поперечного перерізу цільових м'язів у першій групі (де не виконували введення аспірату кісткового мозку) (медіана становила –  $1,1 \text{ см}^2$ ), в третій групі експериментальних тварин (медіана –  $1,0 \text{ см}^2$ ) – відмічали найнижчу площу поперечного перерізу цільових м'язів. Дещо подібні дані були отримані при статистичному аналізі рентгенологічної щільності цільових м'язів кінцівок. Найбільшою рентгенологічна щільність цільових м'язів була в першій групі (медіана –  $69,21 \text{ HU}$ ), незначно менші показники відмічали в другій групі експериментальних тварин (медіана –  $67,66 \text{ HU}$ ), найнижчий показник – був в третій дослідній групі (медіана –  $66,82 \text{ HU}$ ).

## **5.2. Дослідження змін у цільових м'язах методом магнітно-резонансної томографії**

Магнітно-резонансна томографія це метод діагностики заснований на вимірюванні електромагнітного відгуку ядер атомів водню, на певну комбінацію електромагнітних хвиль в сталому магнітному полі. Цей метод широко використовується для діагностики уражень різних органів та тканин людського організму, а також завдяки різноманітним режимам дозволяє візуалізувати м'якотканинні структури та насичення їх атомами водню.

Отже, магнітно-резонансна томографія дозволяє нам не лише візуалізувати зміни скелетних м'язів в денерваційно-реіннерваційний період (такі як набряк чи гіпотрофія скелетного м'язу – рис. 5.4), але також в багатьох випадках може

допомогти визначити причину вказаних змін відповідно до анатомії. Окрім цього, магнітно-резонансна томографія може також надати нам корисну інформацію щодо прогнозу відновлення денервованого скелетного м'язу заснованого на його візуалізації при різних типах ураження периферичного нерву (8-10).

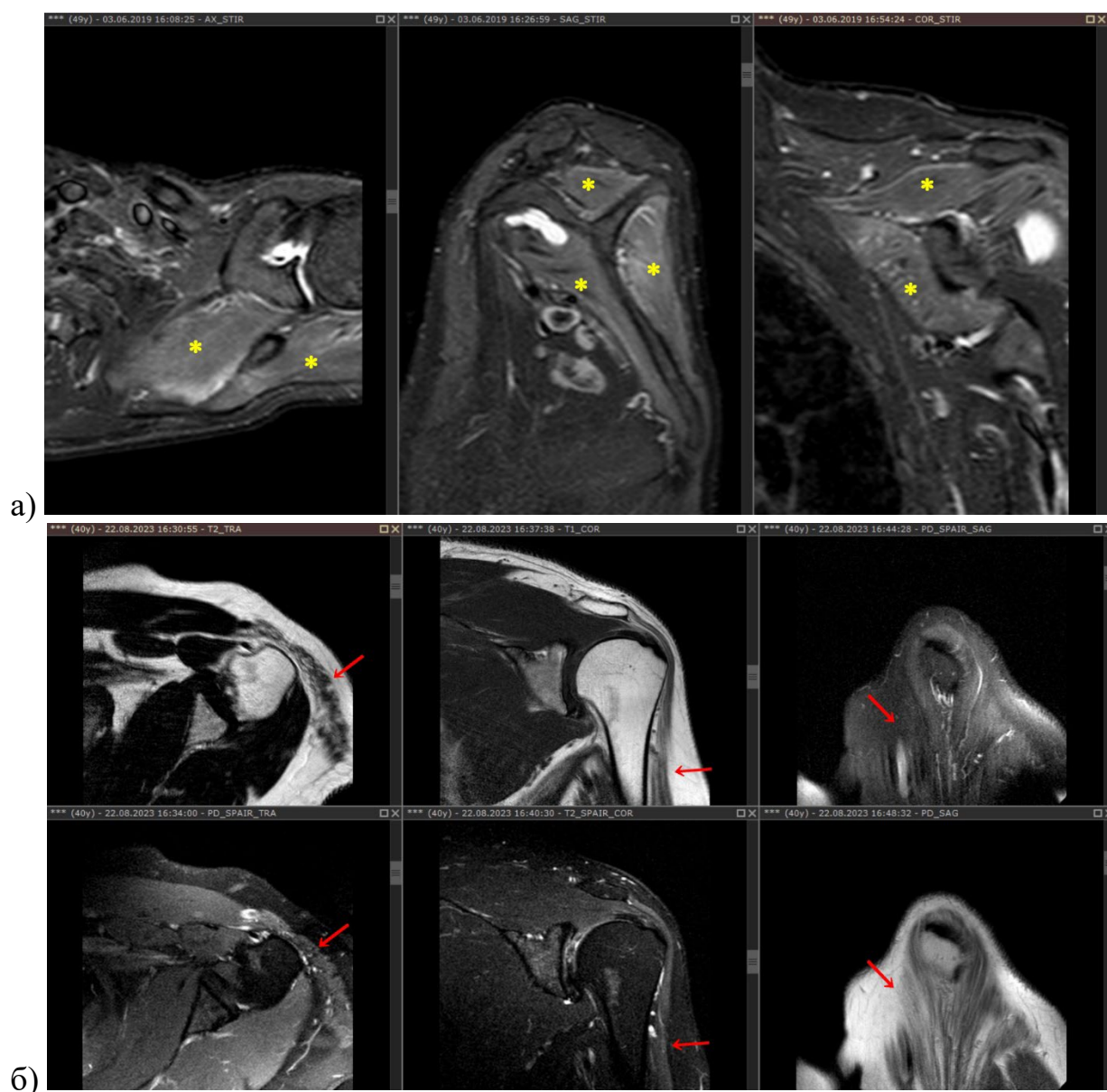


Рисунок 5.4 – Візуалізація проявів набряку (а – м'язи ротаторної манжети плеча відмічені жовтими зірочками) та гіпотрофії і фіброзно-жирового заміщення (б – застаріле ушкодження пахвового нерву що проявляється фіброзно-жировим заміщенням дельтоподібного м'язу – вказано червоною стрілкою) м'язів у пацієнтів з травмами периферичних нервів.

З метою вивчення показників магнітно-резонансної томографії та візуалізації змін що виникають в скелетних м'язах після ушкодження та відновлення периферичного нерву ми вирішили включити даний метод обстеження в наше експериментальне дослідження.

Середні значення вимірювань даних вираженості сигналу магнітно-резонансної томографії з цільових м'язів (m. Tibialis anterior та m.Gastrocnemius) експериментальних тварин в дослідних групах на різних етапах денерваційно-реіннерваційного процесу наведені в таблиці 5.2. В якості показників норми нами обрані дані вираженості сигналу цільових скелетних м'язів в режимах T1 та T2 що були визначені під час магнітно-резонансного томографічного дослідження не оперованих (контралатеральних) тазових кінцівок тварин. З метою об'єктивізації отриманих нами в результаті дослідження даних та спрощення проведення статистичних розрахунків вираженість сигналу м'язової тканини при проведенні магнітно-резонансної томографії в різних режимах представлені в умовних одиницях сірого (УОС), а також проводили їх порівняння з показниками контралатеральної кінцівки, та визначали відсоток змін від норми (% N).

Таблиця 5.2 – Результати вимірювань вираженості сигналу за даними магнітно-резонансної томографії цільових м'язів.

Термін	Група	Середня вираженість MP-сигналу в режимі T1 m. Tibialis anterior		Середня вираженість MP-сигналу в режимі T2 m. Tibialis anterior		Середня вираженість MP-сигналу в режимі T1 m. Gastrocnemius		Середня вираженість MP-сигналу в режимі T2 m. Gastrocnemius	
		(УОС)	% N	(УОС)	% N	(УОС)	% N	(УОС)	% N
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8 тижнів	1 група	11223,39 ± 1110,10	117,72	2833,06 ± 788,91	372,45	11724,87 ± 1033,29	120,21	2460,45 ± 217,27	394,17
	2 група	1304,48 ± 203,99	110,57	6587,76 ± 1836,29	258,05	1203,62 ± 60,73	105,33	4092,75 ± 472,20	229,47
	3 група	3790,58 ± 132,50	103,86	871,98 ± 146,90	171,07	3766,30 ± 348,06	105,05	898,11 ± 104,15	237,84
12 тижнів	1 група	3934,92 ± 422,52	114,54	548,03 ± 200,62	145,69	3843,41 ± 363,69	112,93	316,52 ± 79,14	142,04
	2 група	1137,85 ± 89,95	94,89	4027,48 ± 1614,42	86,22	1043,51 ± 51,82	103,25	1911,60 ± 386,65	52,42
	3 група	7146,30 ± 578,60	111,96	2773,84 ± 598,99	158,65	6120,60 ± 626,99	106,35	3798,51 ± 564,85	395,06
16 тижнів	1 група	1483,52 ± 93,52	103,55	381,87 ± 110,26	112,75	1424,82 ± 117,65	107,26	553,20 ± 53,05	248,83
	2 група	4168,33 ± 488,75	106,93	4360,64 ± 999,77	228,94	4097,05 ± 329,89	110,57	2192,27 ± 614,44	151,10
	3 група	6905,46 ± 528,54	106,48	1664,38 ± 706,67	169,39	6929,71 ± 402,46	109,22	1086,09 ± 197,40	142,11

Отримані в ході дослідження показники експериментальних тварин контрольної групи (група де виконували лише хірургічний доступ та мобілізацію сідничного нерву) – практично не відрізнялись від показників норми (показники контрлатеральних, не оперованих кінцівок тварин).

Оскільки на даний момент відсутня загальноприйнята цифрова шкала вираженості сигналу при магнітно-резонансній томографії, і заключення виконують в описовому форматі – дані що були отримані під час дослідження (рис. 5.5) виражались в умовних одиницях сірого, а з метою статистичного аналізу даних використовували відносні величини – відсоток відхилення від значень норми.

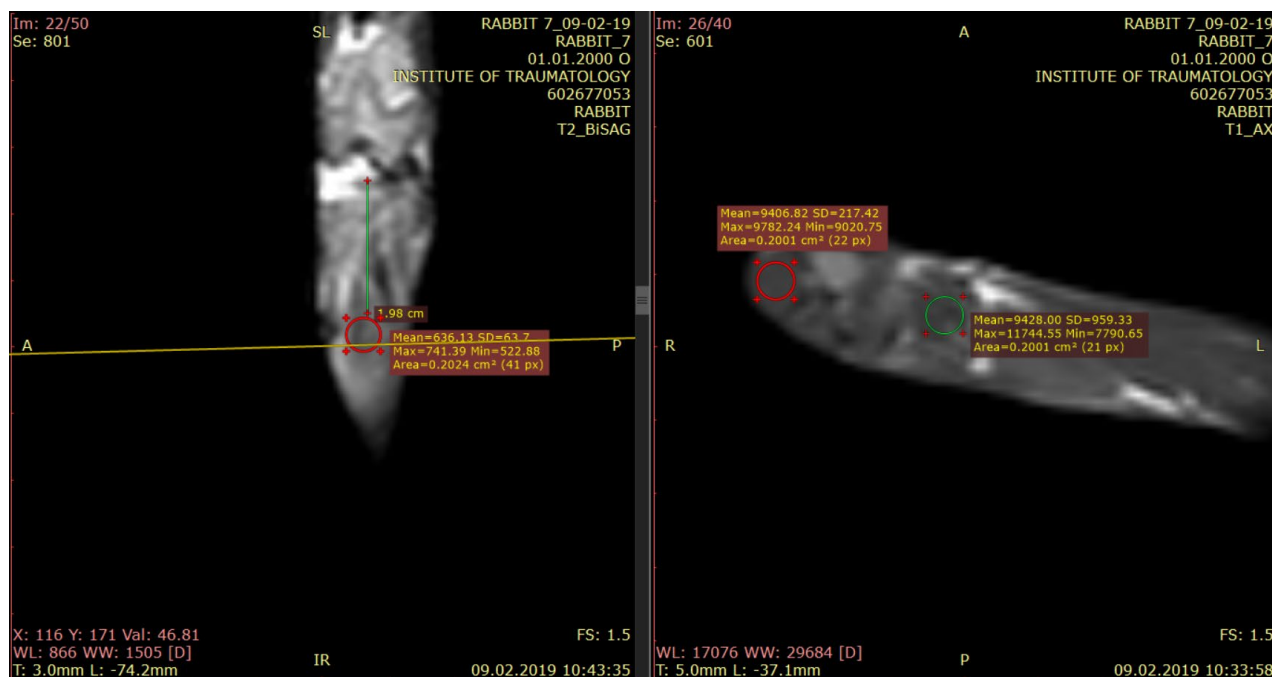


Рисунок 5.5 – Проведення розрахунків з вимірювання вираженості сигналу при магнітно-резонансній томографії.

З метою більш наглядної візуалізації динаміки змін показників середньої вираженості сигналу при магнітно-резонансному обстеженні в режимі T1 піддослідних тварин – наведемо отримані нами дані у вигляді діаграм (рис. 5.6 та 5.7).

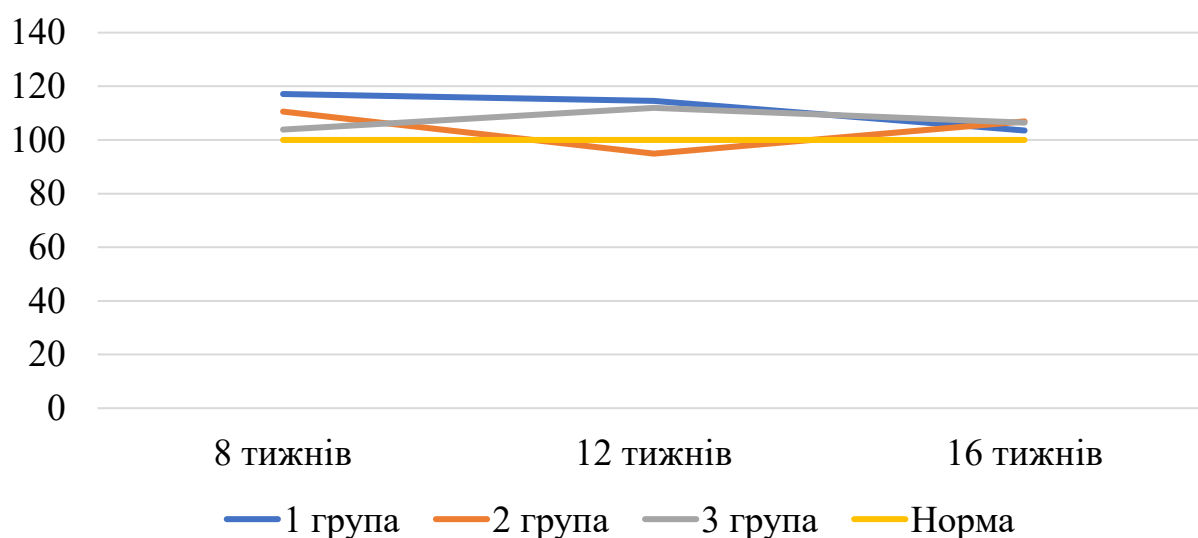


Рисунок 5.6 – Динаміка змін вираженості сигналу в режимі T1 при проведенні магнітно-резонансної томографії m. Tibialis anterior.

Як видно з наведеного вище графіку – в першій дослідній групі протягом всього періоду дослідження спостерігається поступове зменшення вираженості сигналу в режимі T1 – що може свідчити про поступове ущільнення м'язової тканини та наближення її до показників норми в третьому терміні. В другій групі (де виконували введення аспірату кісткового мозку одночасно з хірургічним втручанням щодо ушкодження та відновлення сідничного нерву) – в другому терміні експерименту (12 тижнів) показники вираженості сигналу з м'язової тканини були навіть дещо меншими за показники норми. В цілому у всіх трьох групах спостерігається рівномірне зменшення показників вираженості сигналу скелетних м'язів та наближення їх до показників норми у третьому періоді дослідження.

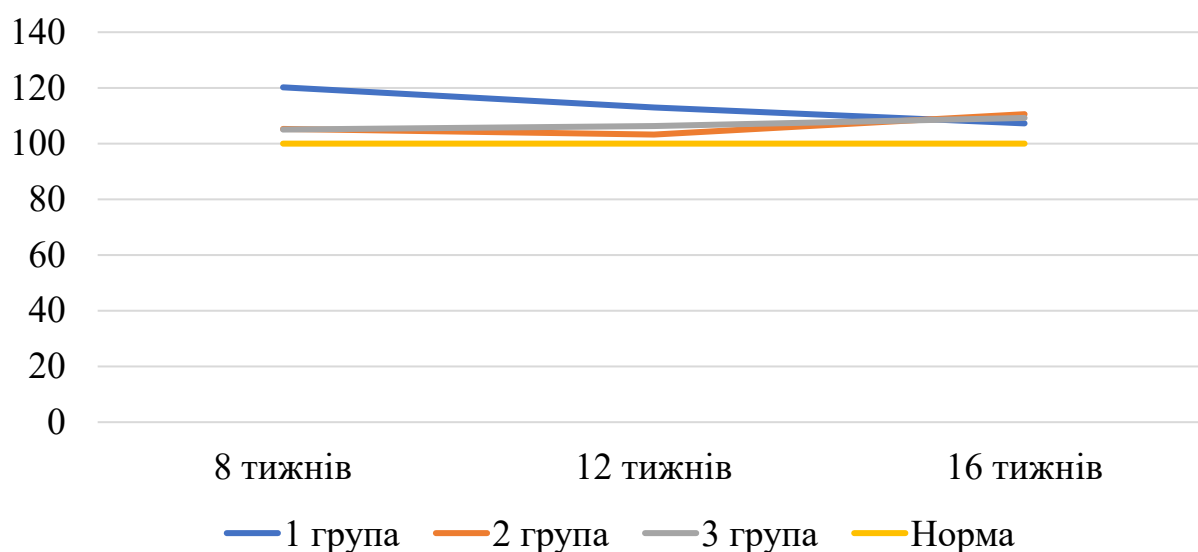


Рисунок 5.6 – Динаміка змін вираженості сигналу в режимі T1 при проведенні магнітно-резонансної томографії m. Gastrocnemius.

При аналізі наведеної вище діаграми звертає на себе увагу рівномірне поступове зменшення вираженості сигналу з зазначеного цільового м'язу в режимі T1 у першій дослідній групі (групі де не виконували введення аспірату кісткового мозку). В той же час показники в інших двох групах протягом перших двох термінів

експериментального дослідження (8 та 12 тижнів) – були близькими до показників норми.

Задля візуалізації динаміки змін показників вираженості сигналу з цільових м'язів в режимі T2 – отримані дані представлені у вигляді відповідних діаграм (рис. 5.8 та 5.9).

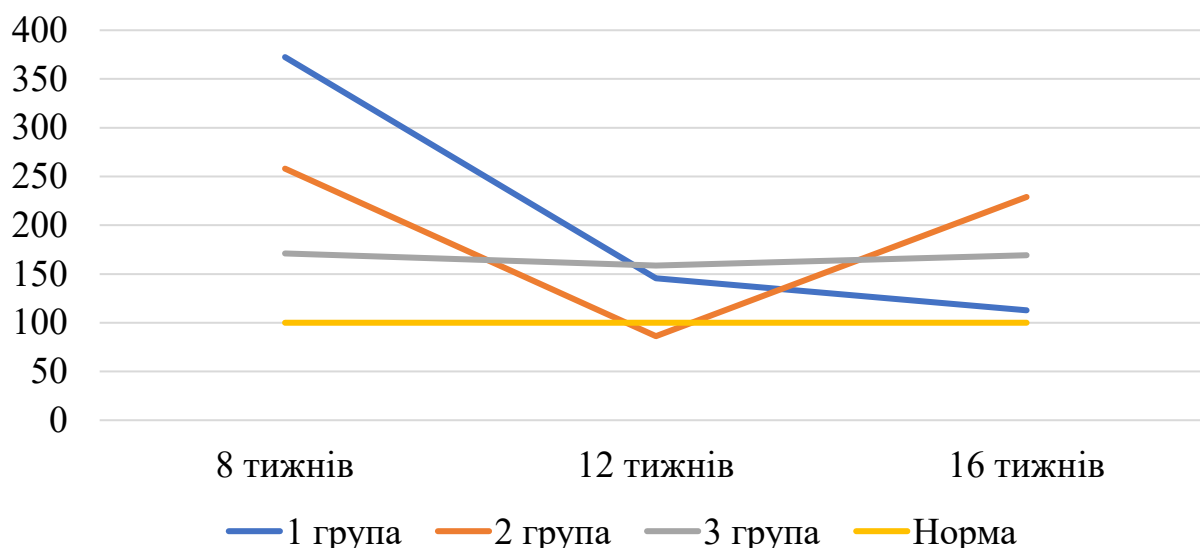


Рисунок 5.8 – Динаміка змін вираженості сигналу в режимі T2 з m. Tibialis anterior.

Як відомо, режим T2 магнітно-резонансної томографії відображає насиченість досліджуваних тканин атомами водню, простіше кажучи – більш виражений сигнал буде відповідати набряку або ж запаленню тканин. При аналізі діаграми представленої на рисунку 5.8 звертає увагу значний набряк цільових м'язів в перший термін після хірургічного втручання, особливо виражений в першій групі. В подальшому відбувається різке спадіння набряку при дослідженні тварин першої та другої груп. Та підвищення показників в другій групі на третій термін експериментального дослідження. В той же час показники третьої експериментальної групи (групи де введення аспірату кісткового мозку виконували у віддаленому періоді) – протягом всіх трьох термінів експериментального дослідження залишались сталими. Це може свідчити про рівномірний процес



зменшення набряку м'язової тканини у експериментальних тварин першої дослідної групи, що пов'язано з перебігом денерваційно-реіннерваційного процесу. Збільшенням набряку в третьому терміні у тварин другої дослідної групи з початком активних фізичних навантажень, та рівномірність перебігу процесів денервації та неоангіогенезу в третій групі.

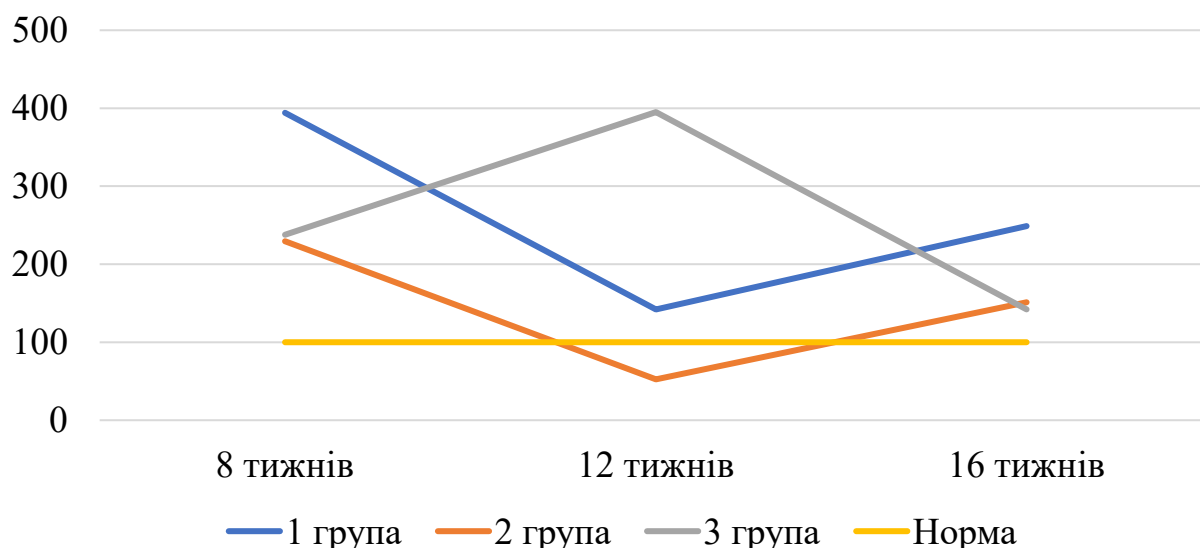


Рисунок 5.9 – Динаміка змін вираженості сигналу з m. Gastrocnemius в режимі T2.

При аналізі діаграми наведеної на рисунку 5.9 видно що показники вираженості сигналу в режимі T2 з цільових м'язів дослідних тварин другої групи був загалом меншим ніж в першій групі, проте мали загальну динаміку до зменшення в другому терміні експериментального дослідження (12 тижнів) та незначного підвищення в третьому терміні. В той час як динаміка перебігу цих процесів в третій дослідній групі була протилежною – зі значним підвищенням в другому терміні (набряк м'язової тканини пов'язаний з віддаленим введенням аспірату кісткового мозку та активним процесом неоангіогенезу).

Виконуючи статистичний аналіз даних що були отримані під час магнітно-резонансної томографії цільових м'язів оперованої та не оперованої тазової кінцівки дослідних тварин – ми виявили достовірну ( $p < 0,01$ ) різницю між

вираженістю сигналу в режимах T1 та T2 з цільових м'язів, з підвищенням вираженості сигналу цільових м'язів оперованої кінцівки в обох режимах у всіх групах дослідних тварин.

Проводячи міжгруповий порівняльний аналіз ми виявили достовірну ( $p < 0,05$ ) різницю вираженості сигналу з цільових м'язів в режимі T1 між групами першою та другою групами, з більш вираженим сигналом в групі 1. Виявлено тенденцію до достовірності різниці ( $p = 0,06$ ) у вираженості сигналу при проведенні магнітно-резонансної томографії в режимі T1 між першою та третьою групами, з більшою вираженістю сигналу в першій групі. Аналізуючи достовірність різниці вираженості сигналу з цільових м'язів в другій та третій групах – достовірної різниці виявлено не було.

Проводячи статистичний аналіз вираженості сигналу з цільових м'язів (m.Tibialis anterior та m.Gastrocnemius) при магнітно-резонансному дослідженні в режимі T2 – достовірної різниці між групами виявлено не було. Однак відмічали загальний більший рівень вираженості сигналу цільових м'язів в режимі T2 в першій групі (медіана – 197,26%), незначно нижчим він був у другій дослідній групі (медіана – 190,02%), а найнижчий – в третій групі експериментальних тварин (медіана – 170,23%).

S. Kamath та співавтори (Kamath et al.) у своєму дослідженні визначили характерні зміни вираженості сигналу м'язової тканини при магнітно-резонансній томографії в гостру та підгостру стадії денерваційного процесу, які проявляються у збільшенні інтенсивності сигналу в режимі T2, та збережені нормальної інтенсивності сигналу скелетних м'язів в режимі T1. Хронічні показники денерваційного процесу краще діагностуються в режимі T1, та візуалізуються як втрати м'язової тканини та поява розріджених ділянок підвищеної інтенсивності сигналу – свідчить про початок жирової інфільтрації м'язу. Різноманітні експериментальні дослідження на тваринах (Kikuchi et al.) демонструють зворотні зміни в скелетних м'язах у разі настання їх реіннервації. Деякі автори зазначають що зміна інтенсивності сигналу при магнітно-резонансній томографії у чутливих

до вмісту рідини режимах (режим T2) нормалізується в період від 4 до 10 тижнів від початку реіннервації ураженого м'язу (West et al.). Характерні зміни що виникають в цільових скелетних м'язах в режимах T1 та T2 залежно від стадії денерваційно-реіннерваційного процесу наведені в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3 – Характерні зміни в цільових м'язах при магнітно-резонансній томографії в залежності від стадії денерваційно-реіннерваційного процесу.

Стадія	Вираженість сигналу	
	Режим T1	Режим T2
Гостра стадія денервації (до 1 місяця)	Норма	Підвищений
Підгостра стадія денервації (1-6 місяців)	Знижений, норма або підвищений	Підвищений
Хронічна денервація (понад 6 місяців)	Підвищений з ділянками жирової інфільтрації	Підвищений
Реіннервація	Норма	Прогресивно знижується до норми

Зважаючи на характер паттернів зміни сигналу з цільових м'язів отриманих в ході експериментальної роботи – всі тварини дослідних груп на період проведення дослідження перебували в підгострій стадії денерваційного процесу.

Отже аналізуючи все вище зазначене можна припустити що введення аспірату червоного кісткового мозку у цільові м'язи під час хірургічного втручання та на початкових стадіях реіннервації (в умовах проведеного експериментального дослідження – термін 7 тижнів після нейротомії та відновлення цілісності сідничного нерву) – сприяє зменшенню вираженості набряку скелетних м'язів, та

проявляється зменшенням площі поперечного перерізу вказаних та вираженості сигналу в режимі T2 при проведенні магнітно-резонансної томографії.

Окрім того, в ході нашого дослідження було встановлено що інтенсивність вираженості сигналу з цільових м'язів в режимі T1 в першій дослідній групі (група де не виконували введення аспірату кісткового мозку) достовірно ( $p < 0,05$ ) була більшою ніж в дослідних групах (друга та третя групи де введення аспірату кісткового мозку виконували одночасно з хірургічним втручанням та через 7 тижнів). Підвищення рентгенологічної щільності та вираженості сигналу магнітно-резонансної томографії в режимі T1 в цільових м'язах першої дослідної групи (де не виконували введення аспірату кісткового мозку) – дає можливість припустити перебіг процесів ущільнення м'язової тканини.

Час введення аспірату червоного кісткового мозку в цільові м'язи суттєво не впливав на досліджувані параметри, хоча введення на ранніх етапах реіннервації характеризувалось меншим набряком зазначених скелетних м'язів.

#### **Публікації до розділу 5:**

Страфун, С.С., Лисак, А.С., Третьяков, Р.А. (2021). Вивчення впливу аспірату кісткового мозку на денервованій м'яз за даними КТ та МРТ досліджень. Вісник Ортопедії, Травматології та Протезування, 111(4), 28-35. doi: 10.37647/0132-2486-2021-111-4-28-35.

## РОЗДІЛ 6

### ГІСТОЛОГІЧНА ТА МОРФОМЕТРИЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ СІДНИЧНОГО НЕРВУ ПІСЛЯ ПОВНОГО ПЕРЕТИНУ ТА НЕЙРОРАФІЇ

Ряд авторів (Zhang et al.; Krarup et al.; Juckett et al.) зауважує на наявності зворотного зв'язку між м'язом на етапах його реіннервації та якістю регенерації периферичного нерву. А саме, скорочення скелетних м'язів, експресія генів та різноманітних факторів росту – покращує щільність регенерації аксонів, шляхом активації зон збудження в центральній нервовій системі. Це в свою чергу сприяє підсиленню антеградної сигналізації та активує регенеративні механізми нейрону. Ми вирішили перевірити це твердження, та провели власне дослідження.

#### 6.1. Загальна морфологічна картина регенерації сідничного нерву

Регенерація пошкодженого в наслідок травми периферичного нерву має свої морфологічні особливості, які полягають у формуванні регенераційної невроми, реакціях сполучної тканини і судин, регенерації нервових волокон через неврому у дистальний відрізок нерву. За результатами гістологічних досліджень у всіх дослідних тварин 1-3 груп встановлено формування невроми та поєднання проксимального і дистального кінців нерву у ділянці шва. Невроми характеризувалися наявністю гліального-сполучнотканинного утворення, в якому виявлено регенерацію нервових волокон. Гістохімічне виявлення колагену засвідчили значну кількість колагену у невромі, його розподіл був варіабельний, а особливо щільні ділянки колагеногенезу відмічено навколо шовного матеріалу, у ділянках поєднання та зростання співставлених фасцикул кінців нерву (Рис. 6.1). Кількісна оцінка невроми тільки морфометричними методами є досить суб'єктивним підходом у оцінці динаміки її формування, тому метод гістохімічного виявлення колагену тільки підтвердив наявність розвитку невроми та значного вмісту сполучної тканини у ній.

Метод імпрегнації азотнокислим сріблом є класичним методом виявлення нервових волокон у периферичних нервах та дослідження динаміки їх регенерації у травмованому нерві. Встановлено наявність нервових волокон у всіх досліджуваних сегментах травмованого нерву – проксимальному, ділянці шва і дистальному. Відмічено, що у проксимальному кінці нерву спостерігали зменшення щільності нервових волокон, порівняно до неушкодженого нерву (контрольна група). Це пояснюється тим, що травматичне пошкодження нерву не тільки полягає у дегенерації “втрачених” нервових волокон у дистальному сегменті, але і частковій “висхідній” дегенерації.

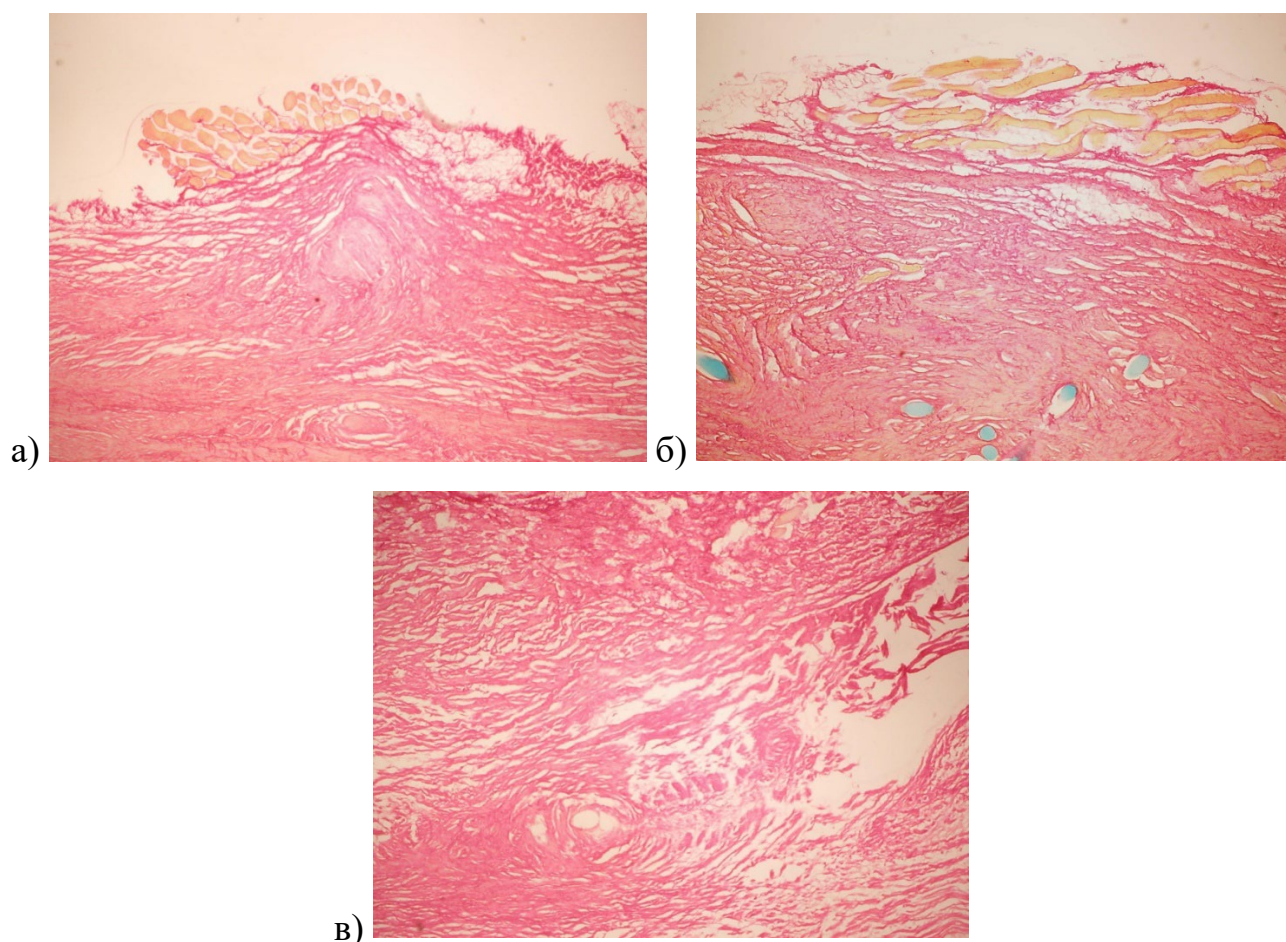


Рисунок 6.1 – Ділянки регенераційної невроми сідничного нерву: а) група 1, 16 тижнів, б ) група 2, 12 тижнів, в) група 3, 16 тижнів. Значна кількість колагену у невромі. Червоний сіріус, пікринова кислота. Об. 4, ок. 10.



На рівні шва нерву виявлено проксимальний і дистальний сегменти нерву, регенерацію волокон у дистальні сегменти та поодинокі новоутворені тонкі нервові стовбури. Епіневрій проксимального та дистального сегментів нерву був збережений, тоді як на рівні шва відмічено збільшення кількості новоутвореної сполучної тканини. Ділянка навколо шва та між кінцями нерву була заповнена активованими нейролемоцитами. Вони формували поздовжньо орієнтовані лінії – стрічки Бюнгнера (Рис. 6.2). Регенерація нервових волокон на рівні шва була неоднорідною, їх щільність зростала при проростанні у фасцикули дистального сегмента.

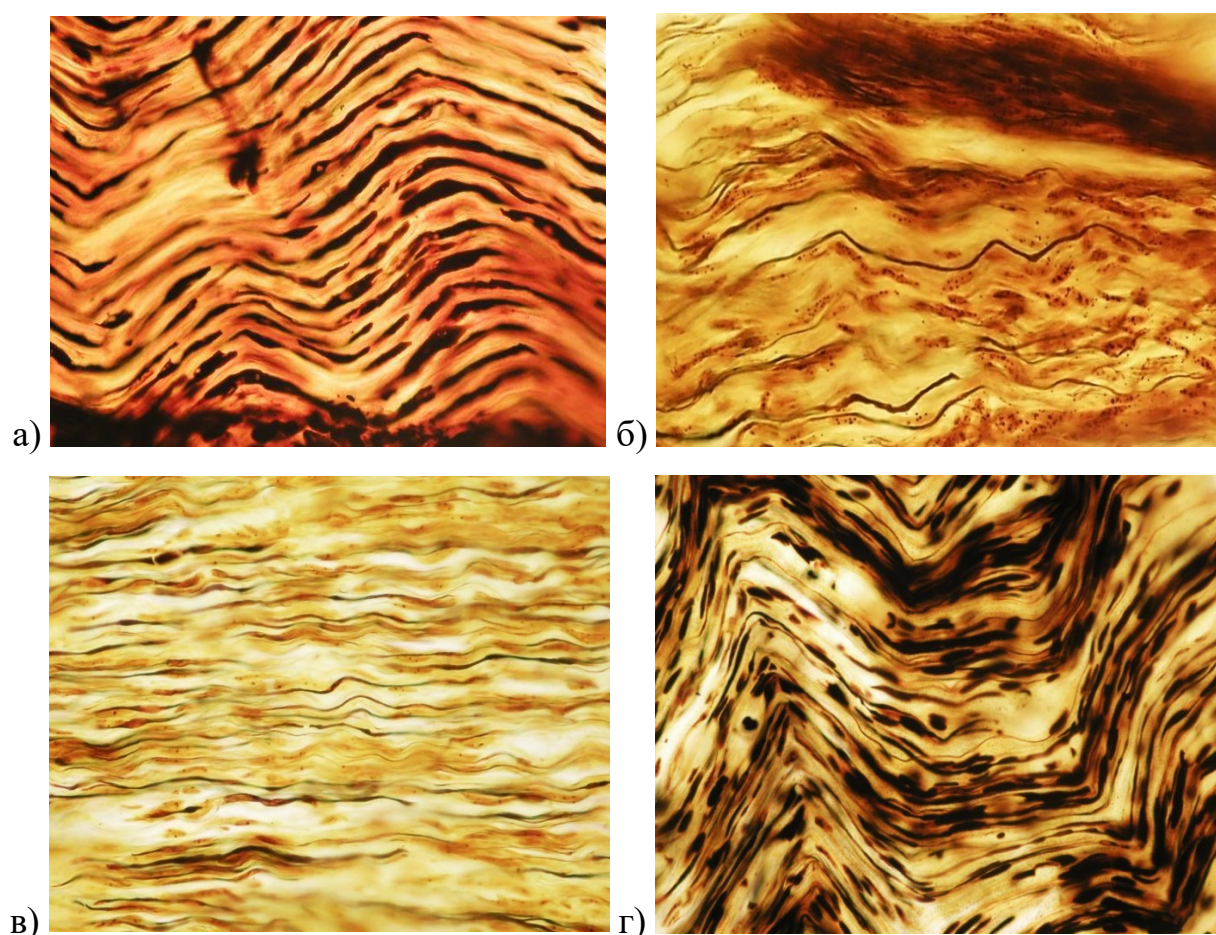


Рисунок 6.2 – Регенерація сідничного нерву через 8 тижнів після пошкодження. Дистальний сегмент нерву, на відстані від невроми 1-2 см: а) контрольна група тварин; б) група 1; в) група 2; г) група 3. Збільшена щільність нервових волокон у групі 2 і 3. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

Нервові волокна у ділянках невроми часто змінювали напрям регенерації, реєстрували поодинокі рекурентні волокна та так звані спіралі Перрончіто. Через 8 тижнів у дистальному відрізку нерву встановлено регенеруючі тонкі нервові волокна (Рис. 6.2). Візуально щільність нервових волокон у неврома та на невеликій відстані у дистальному нерві (орієнтовно на 1-2 см та 5-6 см) була більшою у групі 2 і 3. Ще більша кількість нервових волокон реєструвалася через 12 тижнів після нейрорафії та введення аспірату кісткового мозку (Рис. 6.3). Щільність нервових волокон у регенеруючих кластерах була більшою, тобто мала місце позитивна динаміка регенерації. Також, у групі 2 і 3 відмічено більшу кількість товстих осьових циліндрів, що вказує на більший рівень відновлення окремих нервових волокон.

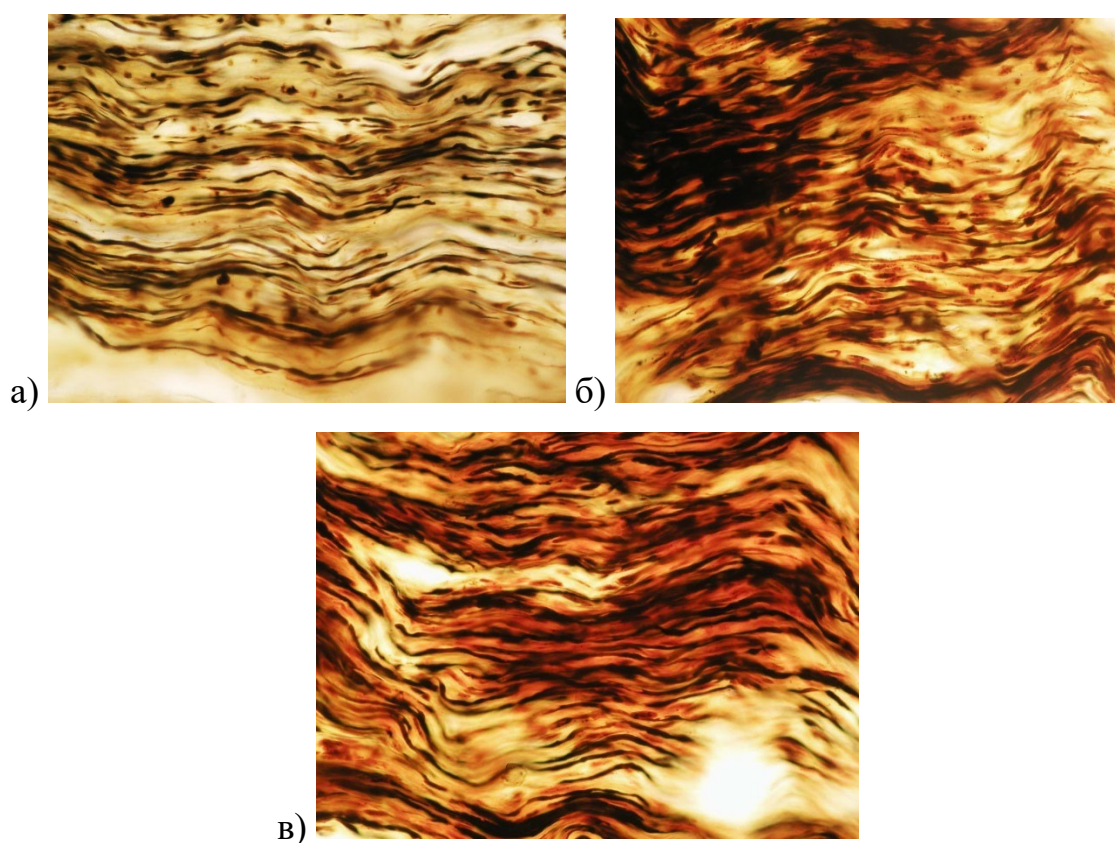


Рисунок 6.3 – Регенерація сідничного нерву через 12 тижнів після пошкодження. Дистальний сегмент нерву, 5-6 см від шва нерву: а) група 1; б) група 2; в) група 3. Збільшена щільність нервових волокон у групі 2 і 3. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.



Через 16 тижнів морфологічна картина у невромі та дистальному сегменті нерву була подібною до терміну 12 тижнів (Рис. 6.4). Єдиною відмінністю було те, що у дистальному сегменті було більше волокон з товстими осьовими циліндрами. Проте, стрічки Бюнгнера із нейролемоцитів ще реєструвалися, тобто процеси регенерації у дистальному сегменті нерву через 16 тижнів ще не завершилися і гіпотетично продовжувалось проростання нервових волокон. Ознак “втрати” структурно змінених фасцикул дистального сегменту через некроз або атрофію нейролемоцитів не відмічено, а регенерацію нервових волокон спостерігали у всіх досліджених зразках. Для виявлення міжгрупової різниці в ефективності регенерації було проведено денситометричне дослідження. Результати наведено нижче.

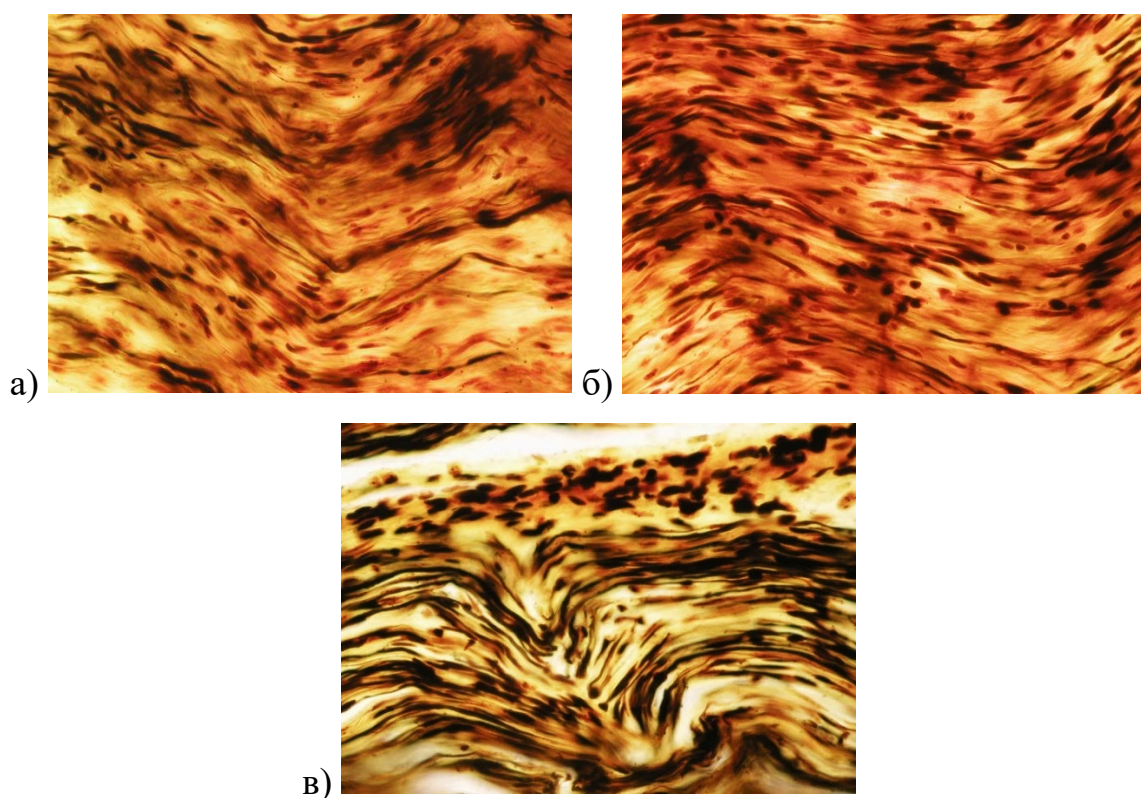


Рисунок 6.4 – Регенерація сідничного нерву через 16 тижнів після пошкодження. Дистальний сегмент нерву, 5-6 см від шва нерву: а) група 1; б) група 2; в) група 3. Збільшена щільність нервових волокон у групі 2 і 3. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

## 6.2. Вплив аспірату кісткового мозку на регенерацію нерву

Регенерація нервових волокон зростала з терміном експерименту. У таблиці 6.1 наведено результати денситометрії, тобто кількісної оцінки нервових волокон на рівні шва і через 5-6 см. На 8 тижень щільність нервових волокон у дистальному сегменті нерву групи 1 становила в середньому 45,8% і 20,8%; у групі 2 – 66,7% і 33,3%; у групі 3 – 52,1% і 41,6% ( $p<0,05$ ). На 12 тижень показник становив: група 1 – 54,1% і 41,6%; група 2 – 75,0% і 72,9%; група 3 – 81,2% і 75,0% ( $p<0,05$ ). На 16 тижень показник становив: група 1 – 66,7% і 47,9%; група 2 і 3 – 77,1% і 72,9% ( $p<0,05$ ).

Таблиця 6.1 – Рівень регенерації сідничного нерву після пошкодження (щільність нервових волокон у дистальному сегменті нерву, од/мм<sup>2</sup>, Me[Q1-Q3])

Група	Термін після пошкодження					
	8 тижнів		12 тижнів		16 тижнів	
Відстань від шва	0-0,5 см	5-6 см	0-0,5 см	5-6 см	0-0,5 см	5-6 см
Контроль	9411,7 [7843,1-9803,9]					
Група 1	4313,7 [3039,2-4901,9] *	1960,7 [1176,4-3235,2] *	5098,0 [4215,6-6666,7] *	3921,5 [1862,7-6470,5]	6274,5 [5000,0-7843,1] *	4509,8 [3431,3-6470,5] *
Група 2	6274,5 [5392,1-7058,8] *#	3137,2 [2352,9-4705,8]*#	7058,8 [5294,1-9019,6]*#	6862,7 [5784,3-7843,1]*#	7254,9 [6274,5-7941,1]*#	6862,7 [6274,5-7843,1]*#
Група 3	4901,9 [3823,5-6274,5] *^	3921,5 [2745,0-4803,9]*#	7647,0 [6274,5-8627,4]*#	7058,8 [6274,5-7843,1]*#	7254,9 [6568,6-7843,1]*#	6862,7 [6176,4-7549,0]*#

Примітка: \* - до контрольної групи ( $p<0,05$ ); # - до групи 1 ( $p<0,05$ ); ^ - до групи 2 ( $p<0,05$ )

Статистичні дослідження показали достовірне зростання щільності нервових волокон що регенерували у нервах 1 групи у термін 8-16 тижнів, а у групі 2 і 3 між терміном 8 і 12 тижнів (різниці між 12 і 16 тижнем не було). Показники у групах 2 і 3 були достовірно більшими від групи 1, але не досягали значень у нервах контрольної групи тварин. Між групами порівняння 2 і 3 статистично більшим був показник у початковому сегменті дистального відрізка нерву (на рівні 0-0,5 см) групи 2 на 8 тиждень щодо групи 3 ( $p < 0,05$ ), тобто при введенні аспірату кісткового мозку безпосередньо після виконання шва нерву, але у наступні терміни різниці не виявлено. На нашу думку, застосування аутологічного аспірату кісткового мозку опосередковано стимулювало регенерацію хірургічно відновленого сідничного нерву, шляхом покращення умов до реіннервації скелетних м'язів та активізації центральної антеградної стимуляції, що проявлялось у збільшенні щільності регенерації нервових волокон та їх відновлення. Введення аспірату безпосередньо після травми стимулювало відновні процеси у більшій мірі, ніж при відтермінованому введенні, але різницю виявлено тільки на ранніх етапах відновлення.

### **6.3. Докази реіннервації скелетних м'язів після нейрорафії та введення аспірату кісткового мозку**

Методом імпрегнації азотнокислим сріблом доведено регенерацію поодиноких нервових волокон та їх невеликих кластерів у скелетні м'язи, групу м'язів гомілки (Рис. 6.5). Дуже рідку регенерацію поодиноких нервових волокон відмічено у тонких нервових стовбурах у м'язах у 1 групі. При цьому у групі 2 і 3 мала місце істотно більша частота реєстрації кластерів нервових волокон що проростають до м'язової тканини. Виявлено досить близьке проростання нервових волокон до симпластів, що вказує на гіпотетичну реіннервацію окремих м'язових волокон. У другій та третій групі тонкі нервові стовбури з регенерованими нервовими волокна встановлено через 12 та 16 тижнів.

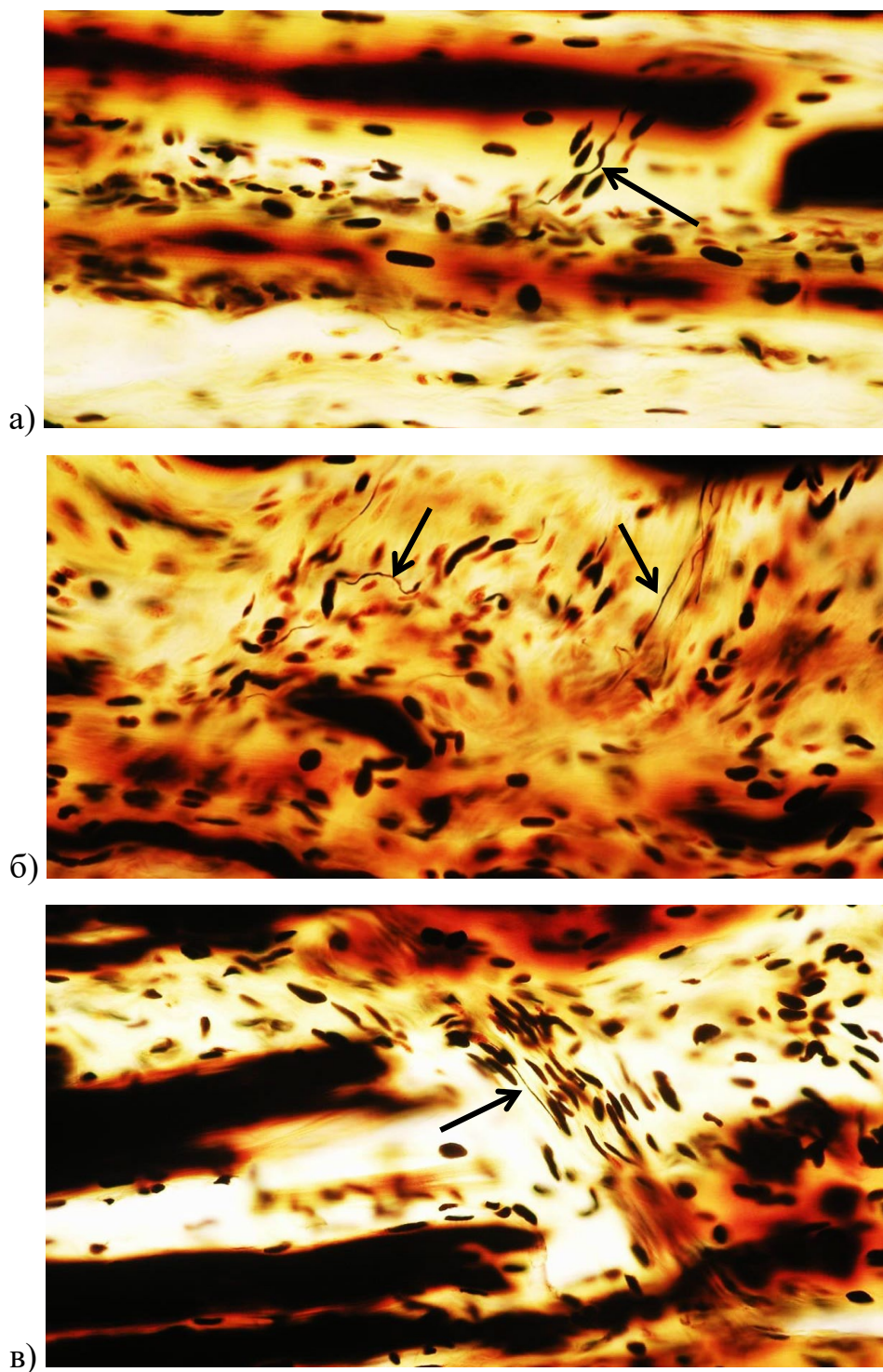


Рисунок 6.5 – Регенерація нервових волокон до м'язових волокон *m.gastrocnemius* через 12 та 16 тижнів після пошкодження та введення аспірату кісткового мозку: а і б – група 2, 12 тижнів; в – група 3, 12 тижнів. Примітка: ← нервові волокна. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

Слід зазначити, що виявлення таких одиниць у м'язах гомілки кролика є непростим завданням, оскільки досить складно знайти місце регенерації нервових стовбурів у міонах, групи міонів мають значну довжину, які виявляються макроскопічно, на відміну від дрібних нервових стовбурів. Так, у мікропрепаратах м'язів площею 0,5-1,5 см виявляються тільки поодинокі нервові стовбури. Тому одержані морфологічні результати тільки підтверджують факт реіннервації м'язів і не можуть бути об'єктивно оцінені кількісними методами.

У всіх випадках встановлено регенерацію сідничного нерву у дистальний відрізок. Результати гістологічних та денситометричних досліджень вказують на те, що введення аспірату кісткового мозку позитивно вплинуло на динаміку регенерації нервових волокон сідничного нерву і навіть покращило реіннервацію скелетних м'язів. При цьому явища регенерації нервових волокон позитивно залежали від факту введення аспірату кісткового мозку через 8 та 12 тижнів після нейрорафії. Раннє введення аспірату стимулювало проростання через неврому більшої щільності нервових волокон, а через 12 тижнів різниці активності регенерації на рівні невроми та у дистальному сегменті нерву між групами 2 і 3 вже не спостерігалася. Тобто встановлено відсутність достовірної різниці щільності регенерації нервових волокон у кінцевому терміні спостереження при ранньому та пізньому введенні клітинного аспірату кісткового мозку. Виявлена більша кількість місць проростання нерву у м'яз вказує на більш активну реіннервацію денервованих м'язів під дією аспірату кісткового мозку.

#### **Публікації до розділу 6:**

Лисак, А.С., (2019). Вплив пунктату кісткового мозку на відновлення пошкодженого сідничного нерва (експериментальне дослідження). *Morphologia*, 13(3), 66-69. doi: 10.26641/1997-9665.2019.3.66-69.

## РОЗДІЛ 7

### СТРУКТУРНІ ЗМІНИ М'ЯЗІВ ГОМІЛКИ ПІСЛЯ ПОВНОГО ПЕРЕТИНУ ТА НЕЙРОРАФІЇ

Скелетні м'язи гомілки експериментальних тварин були дослідженні гістологічними методами на 8, 12 і 16 тижні після перетину сідничного нерву і нейрорафії епіневральним швом. Як описано раніше у публікації (Lysak et al.), у денервованих м'язах виникає гіпотрофія м'язових волокон. Достовірними кількісними характеристиками цього було зменшення діаметру м'язових волокон та їх кількості у одиницях досліджуваних зразків м'язів. Вже на 8 тижні після пошкодження сідничного нерву спостерігається зменшення щільності м'язових волокон, що пояснюється збільшенням кількості колагену у м'язовій тканині, між міонами і особливо у ділянках з істотною гіпотрофією. Далі відбувається тільки зміни діаметру м'язових волокон. У денервованому м'язі спостерігаються одночасно два протилежних прояви реакції м'язових волокон – атрофія і гіпертрофія. Атрофія полягала у зменшенні кількості та товщини м'язових волокон, появи у м'язах збільшеної кількості жирової тканини (Рис. 7.1). Гіпертрофію окремих м'язових волокон або деяких невеликих міонів у групі м'язів гомілки частіше виникає на 16 тижні. Структурні зміни у м'язах можуть набувати вираженої мозаїчності: істотна гіпотрофія з колагеногенезом у одних міонах і виражена гіпертрофія інших (діаметр м'язових волокон може різнитись у 2-3 рази). Така мозаїчність характерна для групи 1 на усіх термінах, у групі 2 на 12 і 16 тижні, у групі 3 на 16 тижні. В цілому спостерігається спільна тенденція – зростання мозаїчності морфології м'язової тканини з часом денервації. Для об'єктивної оцінки динаміки змін м'язової тканини та дії аспірату кісткового мозку було проведено гістохімічне та морфометричне дослідження. Перше полягало у кількісній оцінці змін сполучної тканини за результатами денситометричного вимірювання вмісту колагену у м'язах. Другий метод полягав у кількісній оцінці



змін товщини м'язових волокон та їх розподілу за діаметром. Результати наведено нижче.

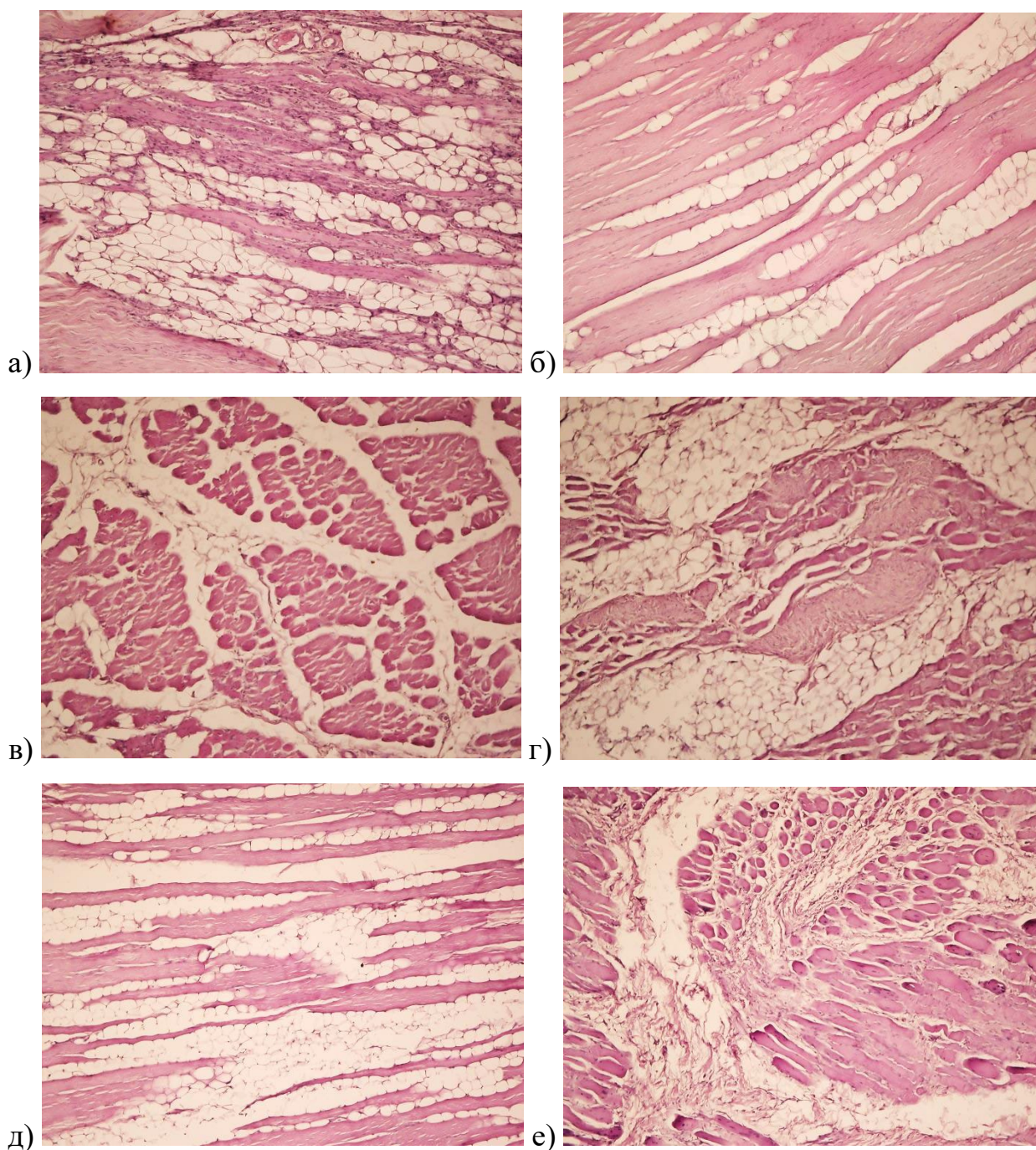


Рисунок 7.1 – Атрофічні зміни *m.gastrocnemius*, м'язова тканина містить збільшену кількість жирової тканини: а і б – група 1 через 8 і 12 тижнів, в і г – група 2 через 12 і 16 тижнів, д і е – група 3 через 12 і 16 тижнів. Гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.



### 7.1. Зміни сполучної тканини у денервованих м'язах

У скелетних м'язах першої групи на 8 тижні виявлено більшу щільність позитивно забарвлених регіонів пікросіріусом червоним порівняно з контролем (різниця  $4,38 \pm 1,63\%$ ,  $p < 0,05$ ), що є результатом збільшення кількості сполучної тканини (Рис. 7.2).

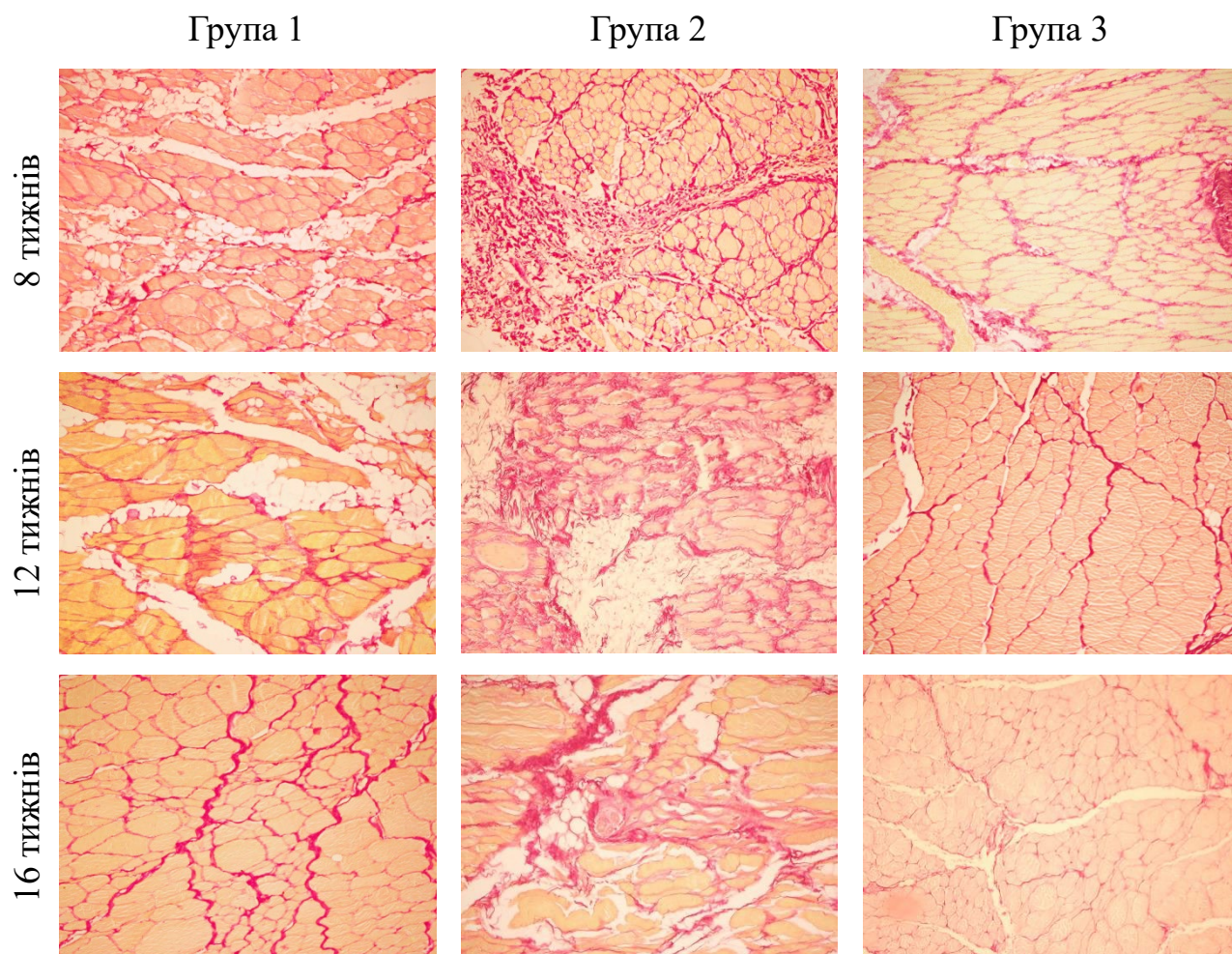


Рисунок 7.2 – Мікрофотографія *m.gastrocnemius* після забарвлення пікросіріусом червоним м'язових волокон (жовтий) і колагену (червоний). Червоний сіріус, пікринова кислота. Об. 10, ок. 10.

У групі 2 щільність забарвлених регіонів була суттєво більшою щодо 1 і контрольної групи тварин на 8 (різниця  $10,2 \pm 2,75\%$ ,  $p < 0,05$ ), 12 (різниця  $6,71 \pm 1,98\%$ ,  $p < 0,05$ ) і 16 (різниця  $22,1 \pm 1,97\%$ ,  $p < 0,05$ ) тижнях. Встановлено статистичну різницю щодо групи 1, а саме збільшення позитивно забарвлених



регіонів на 12 (різниця  $6,33 \pm 1,78\%$ ,  $p < 0,05$ ) і 16 (різниця  $21,0 \pm 2,21\%$ ,  $p < 0,05$ ) тижні. Ці дані вказують на те, що введення аспірату кісткового мозку після нейрорафії викликає клітинні реакції сполучної тканини з синтезом колагену, стимулює колагеногенез.

У групі 3 збільшену щільність колагену виявлено на 8 тижні щодо контролю (різниця  $8,56 \pm 2,15\%$ ,  $p < 0,05$ ). На 12 і 16 тижнях різниці щодо 1 і контрольної групи тварин не виявлено; щільність колагену була більшою щодо групи 1 на 8 (різниця  $2,24 \pm 0,96\%$ ,  $p < 0,05$ ) і 12 (різниця  $5,61 \pm 1,64\%$ ,  $p < 0,05$ ) тижні. При цьому показник був достовірно меншим щодо групи 2 на 16 тижні (різниця  $17,5 \pm 2,94\%$ ,  $p < 0,05$ ).

Як заключення, різниця між групами 1, 2 і 3 вказує на те, що введення клітин аспірату кісткового мозку після нейрорафії стимулює більше утворення колагену, ніж після введення клітин аспірату на 7 тижні після нейрорафії.

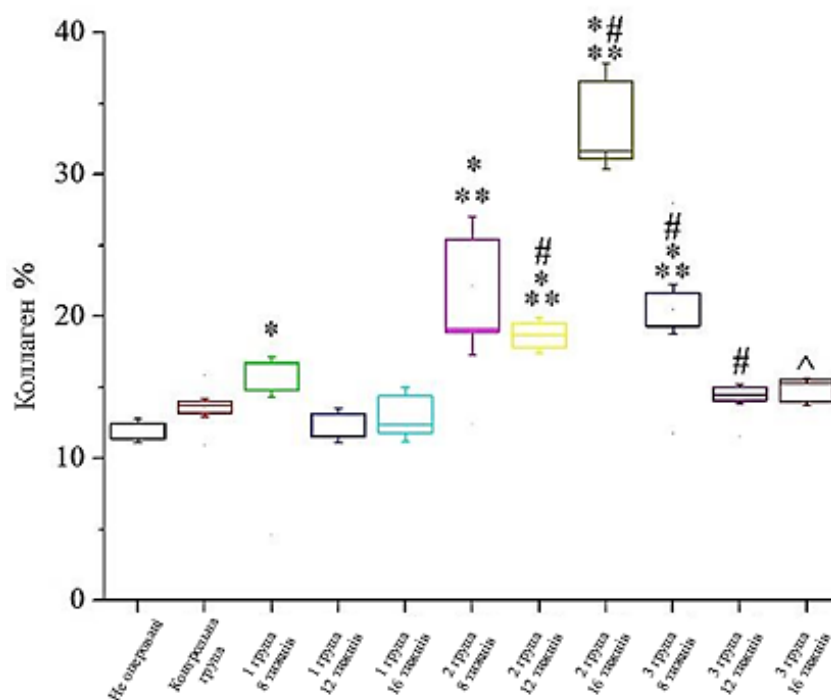


Рисунок 7.3 – Графік кількісного вимірювання колагену у гістологічних мікропрепаратах *m.gastrocnemius* після забарвлення пікросіріусом червоним. \*  $p < 0,05$  до контролю; \*\*  $p < 0,05$  до псевдооперованих тварин; #  $p < 0,05$  до групи 1; ^  $p < 0,05$  до групи 2 (термін 3)

## 7.2. Кількісна оцінка атрофії м'язів

Аналіз кількості м'язових волокон у *m.gastrocnemius* свідчить про достовірне їх зменшення у першій та другій групах (Рис. 7.4). Динаміка зміни показника у групах 1 і 2 була подібною, але у другій групі різниця між термінами 8 і 12 тижнів (різниця 27,5%;  $p < 0.05$ ), 12 і 16 тижнів (різниця 27,7%;  $p < 0.05$ ) була достовірною. На 8 тижні кількість м'язових волокон у групі 2 була достовірною більшою щодо групи 1 (різниця 27,5%;  $p < 0.05$ ), на 12 і 16 тижнів різниця зміни показника була у межах статистичної похибки. Це може свідчити про те, що введення клітин аспірату кісткового мозку безпосередньо після пошкодження частково запобігає атрофії, але в наступні терміни зміни прогресують.

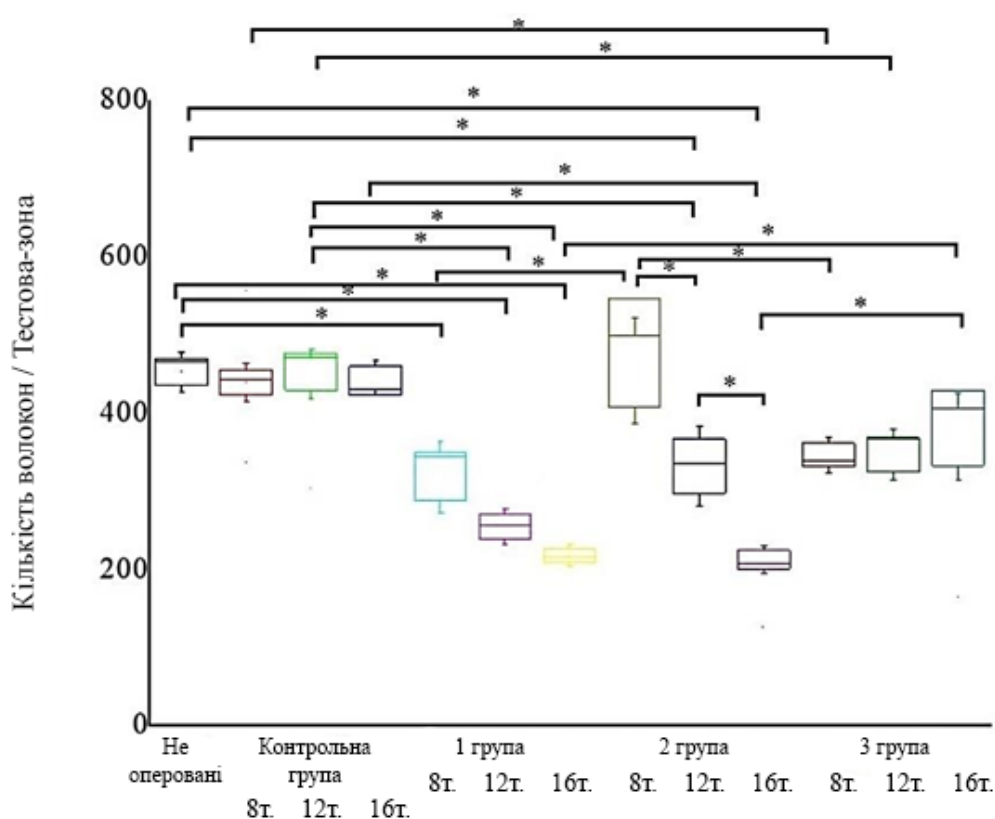


Рисунок 7.4 – Кількість м'язових волокон у *m.gastrocnemius* на тлі денервації. \* $p < 0,05$

У групі 3 кількість м'язових волокон була статистично меншою щодо контрольної групи тварин. Показник між групами 1 і 3 не відрізнявся у термін 8-12

тижнів, а статистично значиму різницю виявлено на 16 тижні експерименту ( $p < 0.05$ ). Порівняно з групою 2 показник був достовірно меншим на 8 тижні, без різниці на 12 тижні, а на 16 тижні кількість м'язових волокон була достовірно більшою щодо групи 1 і 2. Це вказує на те, що введення клітин аспірату кісткового мозку на 7 тижні після пошкодження зменшує динаміку атрофії м'язових волокон у наступні терміни.

Негативну кореляцію виявлено між кількістю м'язових волокон та рівнем фіброзу у *m.gastrocnemius*. У групі 1 виявлено високу негативну залежність на 12 ( $r = -0,75$ ;  $p = 0,001$ ) та 16 ( $r = -0,84$ ;  $p = 0,002$ ) тижнях; у групі 2 високу залежність на 8 ( $r = -0,73$ ;  $p = 0,05$ ), слабку та середню на 12 ( $r = -0,26$ ;  $p = 0,34$ ) та 16 ( $r = -0,54$ ;  $p = 0,03$ ) тижнях; у групі 3 слабку та середню силу кореляції на 8 ( $r = -0,36$ ;  $p = 0,18$ ), 12 ( $r = -0,55$ ;  $p = 0,03$ ) та 16 ( $r = -0,33$ ;  $p = 0,22$ ). Ці результати вказують на зв'язок гіпотрофії м'язових волокон з колагеногенезом у *m.gastrocnemius*, особливо у групі 1.

Різниця показників за результати морфометрії *m.gastrocnemius* залежали не тільки від атрофічних змін окремих м'язових волокон. Додатково проведено аналіз діаметру м'язових волокон і розподіл волокон за діаметром (Рис. 7.5 і 7.6). На тлі денервації виявлено одночасно два прояви змін м'язових волокон: поява атипово тонких, атрофічних волокон (діаметром менше 40 мкм) і гіпертрофія окремих волокон (діаметр понад 160 мкм). Як видно з діаграм (Рис. 7.5), у 1 групі  $< 5\%$  тонких волокон виявлено у всі терміни експерименту, а гіпертрофованих  $\geq 6\%$ . У 2 групі  $\sim 5\%$  тонких атрофічних волокон виявлено на 16 тижні, а гіпертрофованих волокон – 2,3%, 7,5% і 1,9% відповідно до термінів експерименту. У 3 групі відносна кількість атипово тонких м'язових волокон була  $< 2\%$ , а гіпертрофованих реєстрували на 12 і 16 тижнях (10,7% і  $< 2\%$ ). Тобто динаміка подібна.

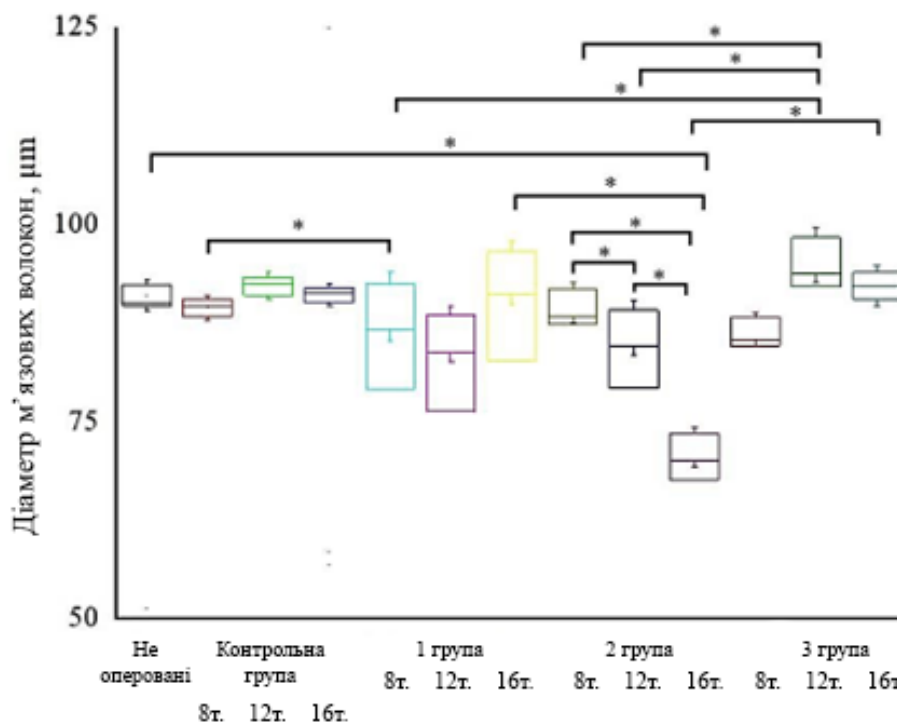
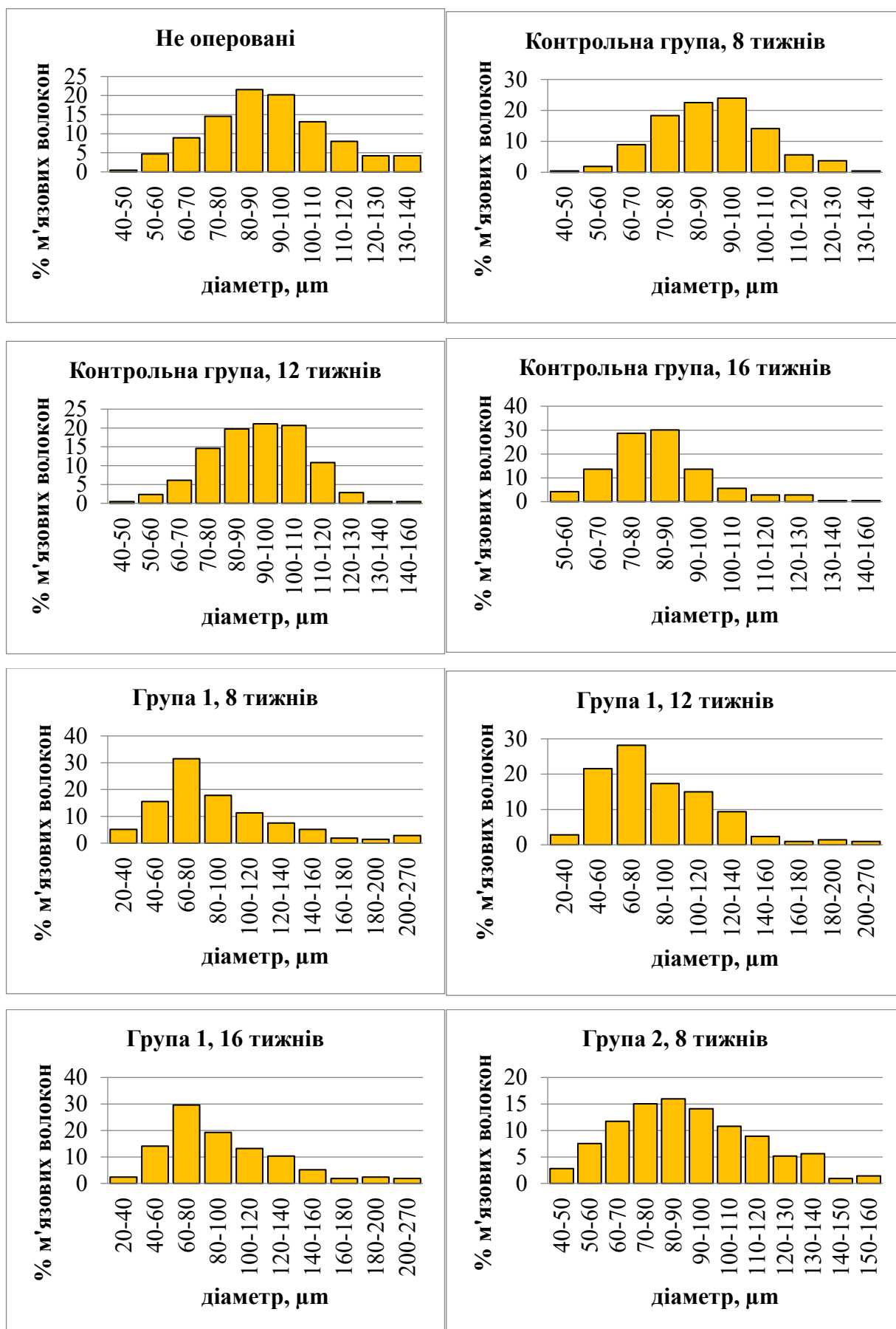


Рисунок 7.5 – Діаметр м'язових волокон у *m.gastrocnemius* на тлі денервації.

\* $p < 0,05$

Аналіз діаграм розподілу м'язових волокон вказує на те, що у третій групі гіпотрофія розвивається меншими темпами порівняно з першою та другою групою, а гіпертрофія, ймовірно, є як компенсаторною реакцією на денервацію, так і на введення клітин аспірату кісткового мозку. Слід відмітити, що поява гіпертрофованих волокон знайшла своє відображення у морфометрії досліджуваних зразків м'язів, тому висновки по дії клітин аспірату формували на основі оцінки кількох показників (кількості, діаметру і розподілу м'язових волокон) потребують додаткових дослідження з аналізом ультраструктури м'язових волокон та метаболічних процесів у м'язах.



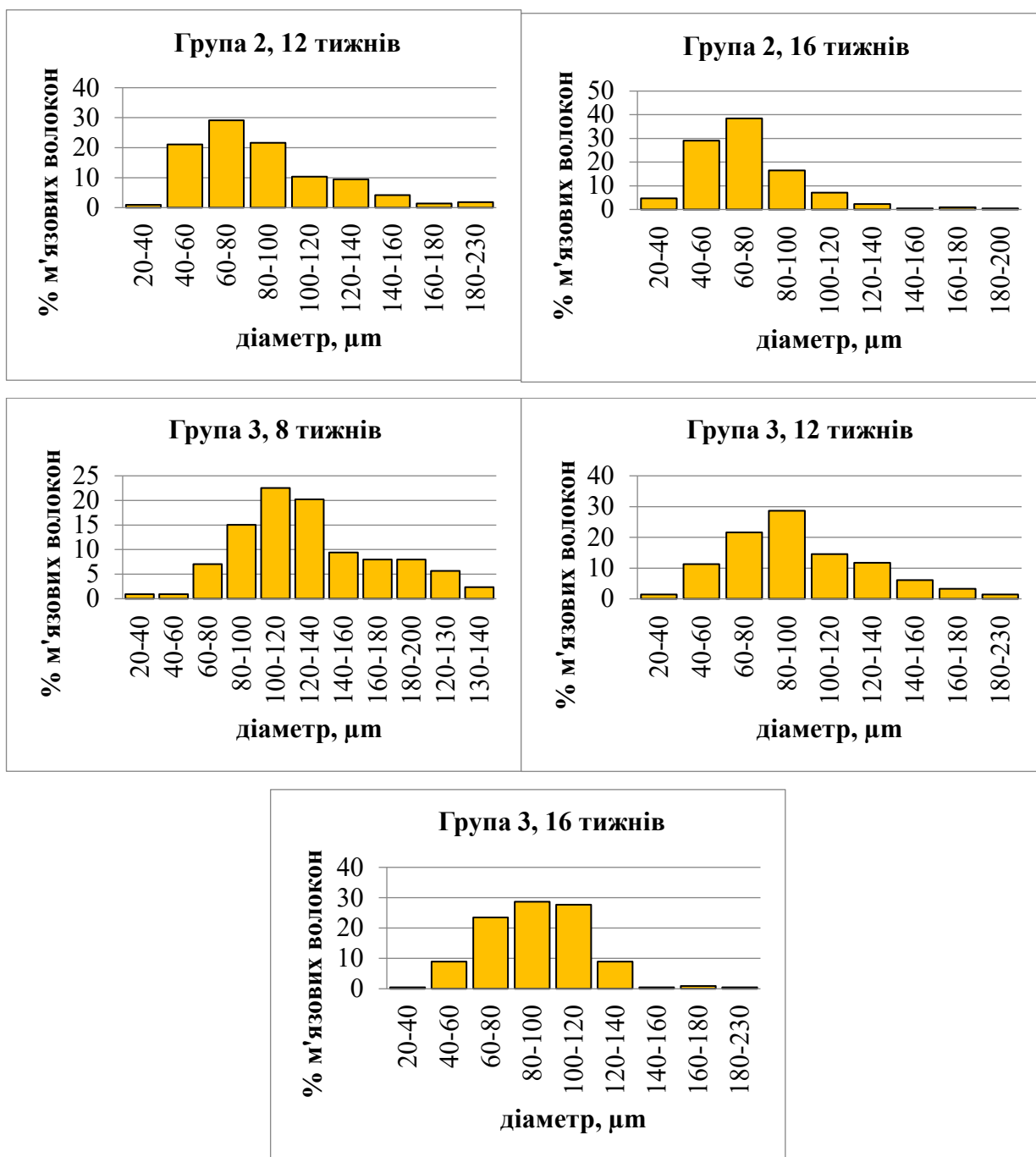


Рисунок 7.6 – Діаграми розподілу м'язових волокон у *m.gastrocnemius* за діаметром (n=213 / групу).

### 7.3. Ультраструктурні зміни міоцитів м'язів гомілки

Всім експериментальним тваринам було проведено електронну мікроскопію відібраних ділянок цільових скелетних м'язів.

За результатами електронної мікроскопії у денервованих скелетних м'язах виявлено зміни, які головним чином полягали у пошкодженні м'язових волокон.

Ультраструктурними проявами порушень були: деструкція і зменшення щільності скоротливих міофібрил у м'язових волокнах (актин-міозинових комплексів), зменшення рівня гранулярності цитоплазми і збільшення її оптичної прозорості (тобто інтрацелюлярний набряк), різка осміофілія матриксу мітохондрій (прояв порушень) або їх набряк і деструкція.

Між групами з травмою нерву виявлено деякі відмінності. У 1 групі пошкодження м'язових волокон було неоднорідне, реєстрували волокна в стані майже повної деструкції міофібрил і набряку цитоплазми (Рис. 7.7), а також волокна з частково збереженими актин-міозиновими комплексами, хоча межі саркомерів (структурна одиниця міофібрил) слабо прослідковувались. У 2 групі також зміни були поліморфними, але на відміну від 1 групи виявлено м'язові волокна з абсолютно збереженими саркомерами, які можна оцінити як інтактні. Додатково часто реєстрували окремі клітини-сателіти вздовж м'язових волокон, які гіпотетично можна розглядати в якості міобластів і це є проявом регенеративних процесів. У 3 групі зміни м'язових волокон були також поліморфними, реєстрували як суттєво порушені волокна, так і відносно збережені. У останніх щільність міофібрил була зменшеною, але межі саркомерів ще реєструвались.

У всіх групах між м'язовими волокнами виявлено кровоносні гемокапіляри з активним ендотеліальним транспортом, на що вказує значна кількість піноцитозних везикул у цитоплазмі. Суттєвої відмінності на рівні капілярів між групами порівняння не виявлено.

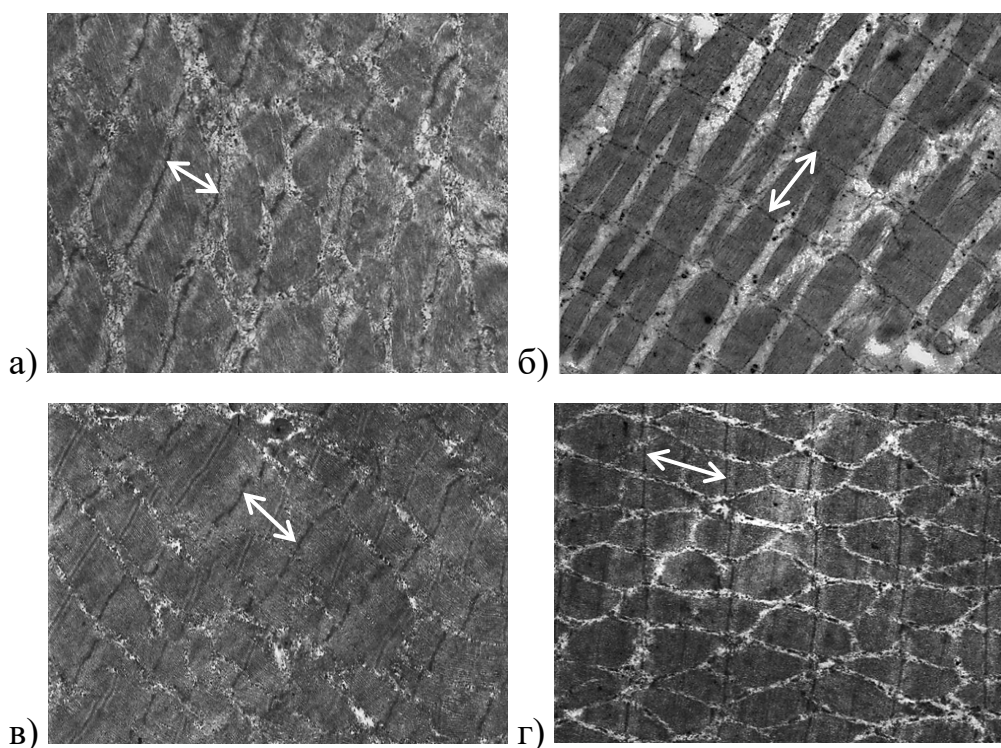


Рисунок 7.7 – Ультраструктура м'язів після невротомії і введення аспірату кісткового мозку через 8 тижнів. а) контрольна група (ориг.зб.25000), б) група 1 – деструкція і зменшення щільності міофібрил (ориг.зб.13800), в) група 2 – міофібрили майже не порушені (ориг.зб.19200), г) група 3 – міофібрили майже не порушені (ориг.зб.11100). Примітка:  $\leftrightarrow$  саркомер. Електронна мікроскопія.

Було проведено морфометричну оцінку саркомерів у виявлених міофібрилах збережених м'язових волокон (Рис. 7.8). Виявлено достовірно більшу середню довжину саркомерів у першій групі через 16 тижнів щодо контрольної групи, термінів спостереження на 8 та 12 тижнів, та інших груп цього ж терміну. Результати кількісних вимірювань свідчать про збільшення довжини саркомерів як прояв їх деструкції та порушення організації комплексів актин-міозин. Тоді як між другою та третьою групами не виявлено достовірної різниці, а також у динаміці спостереження у межах цих груп. Тобто введення аспірату кісткового мозку позитивно вплинуло та відтерміновало деструкцію скоротливих міофібрил у м'язових волокон.



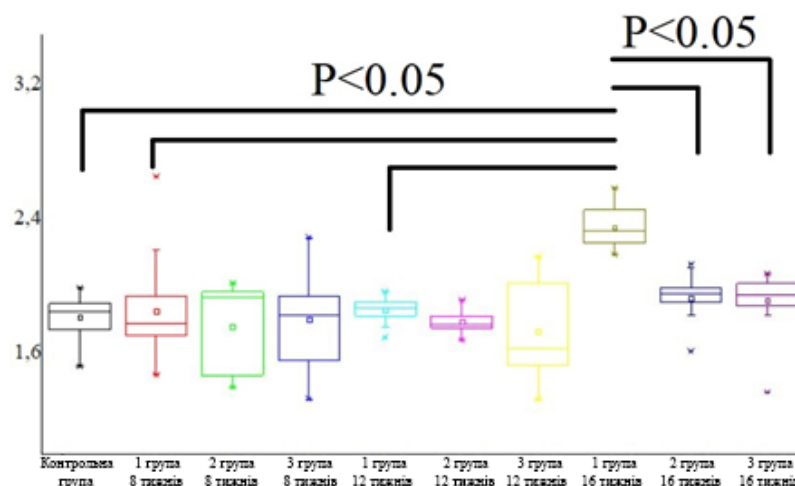


Рисунок 7.8 – Довжина саркомерів у скоротливих міофібрилах м'язових волокон, за результатами морфометрії.

Слід зазначити, що крім порушення скоротливих міофібрил у м'язових волокнах реєстрували ознаки аутофагів та некроптозу (Рис. 7.9). Ультраструктурними проявами цих змін були атипові ламелярні утворення та групи цистерн (гіпотетично саркоплазматичної сітки), які оточували (захоплювали) інші структури у цитоплазмі, атипові за структурою везикули та їх поєднання у цитоплазмі м'язових волокон. Ці утворення виявлено у всіх трьох досліджених групах, єдина відмінність полягає у більш ранній їх появі у першій групі. Появи таких утворень є доказом процесів некробіозу у денервованих м'язах. Ці зміни виявлено у групі 1 через 8 тижнів та групі 2 і 3 через 12 та 16 тижнів. Ми не можемо достовірно стверджувати про залежність таких процесів від терміну та груп, так як зазначені зміни не були тотальними і реєструвалися у окремих м'язових волокнах. Проте певна тенденція на більш ранню їх появу у групі 1 спостерігалась.

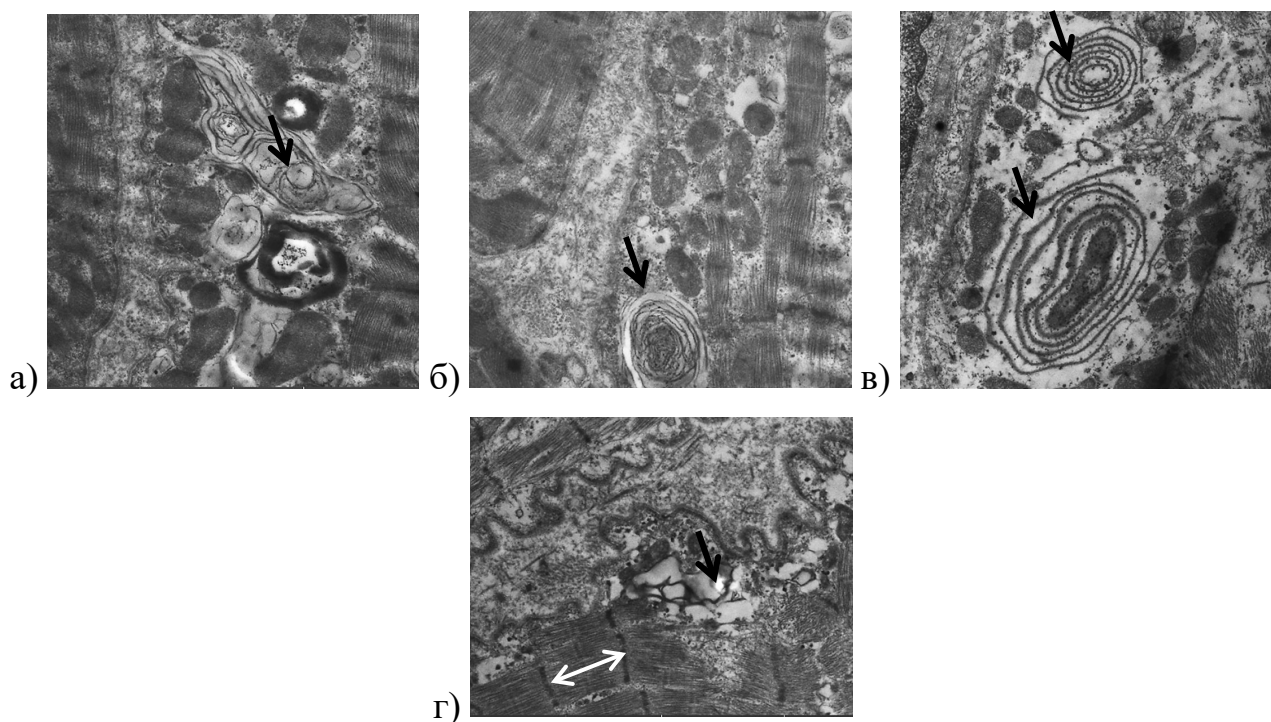


Рисунок 7.9 – Атипові ультраструктурні утворення у м'язових волокнах денервованих м'язів після невротомії і введення аспірату кісткового мозку через 12 та 16 тижнів: а) група 1, 8 тижнів – ламелярні структури і явища аутофагії (ориг.зб.110000), б) група 1, 12 тижнів – ламелярні структури (ориг.зб.110000), в) група 3, 16 тижнів – ламелярні структури (ориг.зб.105000), г) група 3 – міофібрили майже не порушені (ориг.зб.92400). Примітка: ← ламелярні структури; ↔ саркомер. Електронна мікроскопія.

Таким чином, головними ультраструктурними проявами пошкодження м'язових волокон на тлі нейротомії є:

1. Набряк цитоплазми;
2. Редукція скоротливих міофібрил;
3. Деструктивні зміни саркомерів у міофібрилах;
4. Поява атипових ламелярних структур у цитоплазмі м'язових волокон: у групі 1 через 8 тижнів, у групі 2 через 16 тижнів, у групі 3 через 12 термінів;
5. Набряк і деструкція мітохондрій м'язових волокон.

Поява ламелярних тілець є наслідком процесів протеолізу у м'язових волокнах і проявом некроптозу або аутофагії при денерваційній атрофії.

Це корелює з більш вираженою гіпотрофією м'язових волокон у цій групі. Поява ламелярних тілець є наслідком процесів протеолізу у м'язових волокнах і проявом некроптозу при денерваційній атрофії. Підвищена аутофагічна активність може бути пов'язана з розпадом клітинних структур у збережених м'язових волокон для забезпечення адаптації та регенерації м'язових волокон. Ймовірно, саме тому описані атипові утворення наявні у структурно збережених м'язових волокнах, тоді як волокна з істотним меншим діаметром характеризуються значною втратою скоротливих міофібрил (актин-міозинові комплекси мають меншу щільність, зменшенням гранулярності цитоплазми і збільшення її оптичної прозорості, інтрацелюлярний набряк). Різка осміофілія матриксу мітохондрій або їх набряк і деструкція у рівні мірі є ультраструктурними ознаками пошкодження м'язових волокон і ці зміни є неспецифічними, тому тільки на основі змін цих органел не можна стверджувати про ступінь порушення енергетичного обміну у м'язових клітинах. Це потребує дослідження біохімічними методами. Таким чином, введення аспірату кісткового мозку частково запобігало розвитку дистрофічних змін, але не зупиняло їх. Ступінь збереження скоротливих міофібрил у групі 3 був кращим щодо групи 1 і 2.

Таким чином, на основі одержаних морфологічних результатів сформульовано гіпотезу про виникнення у денервованих м'язах певного критичного стану, перетин якого призводить до атрофії м'язових волокон, а у субкритичному стані м'яз перебуває у стані гіпотрофії і компенсації. Проявом першого є зменшення діаметру і появу атипових продуктів деструкції у цитоплазмі м'язових волокон, а другого – гіпертрофія м'язових волокон. Передбачається, що дія клітин аспірату кісткового мозку може пролонгувати субкритичний стан денервованого м'язу і стимулювати регенерацію травмованого нерву. Разом з тим, небажаний результатом застосування клітинного аспірату є активація колагеногенезу у місці локального введення клітин і, як наслідок, пошкодження

м'язової тканини. Як відомо, скелетні м'язи можуть зазнати достовірного ураження навіть під час відносно коротких періодів ішемії та імобілізації. Тому перспективним напрямком подальших досліджень є одержання очищеного клітинного аспірату і вивчення його ізольованої дії на диференціацію нейролемоцитів нерву і міобластів у денервованих м'язах.

**Публікації до розділу 7:**

Lysak, A., Savosko, S., Strafun, S., Utko, N., Makarenko, O. (2022). Effect of bone marrow aspirate in denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Wiadomości Lekarskie Medical Advances*, 75(3), 634-640. doi: 10.36740/WLek202203112.

## РОЗДІЛ 8

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ БІОХІМІЧНИХ ЗМІН У СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ ПІСЛЯ ДЕНЕРВАЦІЇ ТА ПЛАСТИКИ НЕРВУ

Завершальним етапом експериментального дослідження структурних змін скелетних м'язів на тлі денервації та введення аспірату кісткового мозку було дослідження антиоксидантної системи як однієї з найбільш реакційних ферментативних систем у пошкоджених тканинах. Аналіз змін продуктів пероксидації ліпідів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), було обрано як показник метаболічних змін у м'язі при пошкодженні. Як видно з таблиці 8.1, рівень ТБК збільшувався щодо контролю у всі терміни експерименту. Виражена тенденція з накопичення ТБК на 8 тижні збільшилась до статистично значущої різниці на 12 і 16 тижнях (різниця у 3,9 і 5,3 рази;  $P < 0,05$ ). У групі 2 рівень ТБК відрізнявся щодо контрольної групи тварин на 16 тижні (різниця у 4,5 рази;  $P < 0,05$ ) і був достовірно меншим від групи 1 (різниця на 48,1%;  $P < 0,05$ ). У групі 3 рівень ТБК був достовірно меншим щодо групи 1 на 12 і 16 тижні і не відрізнявся від контрольної групи тварин. Ці дані вказують на те, що при атрофії м'язів накопичуються продукти перокисного окиснення ліпідів, що є показником пошкодження клітин, і вони зменшуються після введення клітин аспірату кісткового мозку, у більшій мірі у групі 3.

У цьому дослідженні ми виявили зменшення активності каталази – ферменту який нейтралізує перекис водню. Останній продукується клітинами на тлі порушеного балансу окисно-відновних реакцій у мітохондріях з утворенням супероксид аніону і перекису водню. У тварин контрольної групи відмічено динаміка зменшення активності каталази між 8, 12 та 16 тижнями, тоді як рівень ТБК-реагуючих продуктів залишився без змін. Цей стан м'язів слід розглядати як короточасну захисну реакцію на факт хірургічного доступу до нерву і відповідним запуском ендогенних механізмів на нейтралізацію активних форм кисню, а далі нормалізацію енергетичних процесів.

У групі 1 виявлено активацію каталази на 12 тижні і далі зменшення, що вказує дещо відтерміновану або пролонговану реакцію на пошкодження.

У групі 2 показник змінювався подібно до контрольної групи тварин, але на 16 тижні виявлено достовірне збільшення, що, ймовірно, є реакцією у відповідь на атрофію.

У групі 3 динаміка подібна до показників контрольної групи, а показник статистично значимо менший щодо другої групи на 8 і 16 тижні.

Таблиця 8.1 – Результати біохімічних досліджень *m.gastrocnemius* на тлі денервації

Група	ТБК нмоль×мг-1	Каталаза мкмоль×хв- 1×мг-1	ГП нмоль×хв- 1×мг-1	ГР нмоль×хв- 1×мг-1	СОД U×хв- 1×мг-1
8 тижнів					
Контроль	0,62±0,16	5,14±0,43	2,15±0,15	2,15±0,24	4,16±0,40
Група 1	1,11±0,17	3,88±0,31	3,88±0,37	3,17±0,35	4,95±0,54
Група 2	1,51±0,34	5,66±0,39*	4,03±0,72	3,40±0,46	5,18±0,46
Група 3	1,58±0,51	4,06±0,38^	3,60±0,27	4,19±0,30	4,66±0,35
12 тижнів					
Контроль	0,75±0,07	3,42±0,02	3,39±0,56	4,59±0,26	4,77±0,52
Група 1	4,33±0,78#**	5,17±0,29#	4,04±0,39	3,22±0,34	5,42±0,16
Група 2	0,97±0,29*	2,47±0,17*	2,15±0,21*#	2,56±0,62	4,10±0,29
Група 3	2,04±0,78*	2,98±0,20*	2,86±0,14	3,55±0,15	4,58±0,18
16 тижнів					
Контроль	0,66±0,13	2,16±0,37#	1,94±0,14	2,34±0,14	4,67±0,47
Група 1	5,89±1,94#**	3,62±0,41	3,3±0,50	3,85±0,43	5,37±1,02
Група 2	3,05±0,12*,**	4,37±0,17@**	3,05±0,37	3,46±0,23	4,01±0,22
Група 3	0,43±0,23*	2,29±0,32^#	1,96±0,24*#	2,10±0,28*#	5,22±0,31

\* $p < 0,05$  до групи 1; #  $p < 0,05$  до терміну 8 тижнів; \*\*  $p < 0,05$  до контрольної групи; ^  $p < 0,05$  до групи 2; @  $p < 0,05$  до терміну 12 тижнів

Глутатіонпероксидаза (ГП) є ферментом, функція якого полягає у нейтралізації перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) та органічних гідропероксидів ( $\text{ROOH}$ ), перетворюючи їх у нетоксичні речовини, такі як вода ( $\text{H}_2\text{O}$ ) або відповідні спирти ( $\text{ROH}$ ). Активність глутатіонпероксидази (ГП) не суттєво відрізнялась між групами. У групі 2 різницю щодо групи 1 відмічено на 12 тижні, а у групі 3 на 16 тижні. В обох групах ці значення були вірогідно меншими від вихідних. Такі результати можуть свідчити про часткову втрату пулу вільних ферментів внаслідок перенапруження ланцюгів антиоксидантної системи. Крім того, білкові молекули ферментів також є субстратом для перекисного окиснення, тому їх рівень теж може знижуватися при гіпоксії тканин.

Додатковою ланкою антиоксидантної системи є глутатіонредуктаза. Її основна функція полягає у відновленні окисненого глутатіону ( $\text{GSSG}$ ) до відновленої форми ( $\text{GSH}$ ), яка необхідна для детоксикації реактивних форм кисню і підтримки клітинного редокс-балансу. Як показали власні результати, активність глутатіонредуктази (ГР) зменшувалась до рівня групи псевдооперованих тварин тільки у групі 3 на 16 тижні, як прояв відновлення метаболічних реакцій. У інших групах кількісні показники були у межах статистичної похибки.

Супероксиддисмутаза (СОД) — це фермент, який каталізує перетворення супероксидного аніону ( $\text{O}_2^-$ ) на менш токсичні продукти — перекис водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і кисень ( $\text{O}_2$ ). Аналіз активності СОД не виявив достовірних динамічних змін та міжгрупової різниці. Це може свідчити про певний баланс у процесах, пов'язаних із реактивними формами кисню та антиоксидантною системою. СОД гіпотетично могла спочатку мати достатньо високий рівень активності, щоб ефективно нейтралізувати супероксиди, навіть без додаткової активації або індукції, а вже через 8 тижнів після травми процеси окиснення та антиоксидантного захисту досягли динамічної рівноваги. У випадках, коли активність СОД не змінилася, а каталази збільшилася, може бути достатній рівень супероксиддисмутази для підтримання стабільного рівня супероксиду ( $\text{O}_2^-$ ), але підвищений рівень утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  потребує адаптації через активацію каталази. Тобто терміни, коли виявлено

збільшення активності каталази слід розглядати як вторинні або повторні негативні зрушення у балансі антиоксидантного захисту.

Таким чином, зміни антиоксидантної системи у першій групі виявилися більш відмінними від контрольної групи порівняно до другої та третьої груп з аспіратом кісткового мозку, тобто за дії аспірату червоного кісткового мозку реакції антиоксидантної системи були менш вираженими, або частково нормалізованими.

З експериментальних досліджень відомо, що найбільш критична втрата маси *m.gastrocnemius* після денервації відбувається у перші 2-4 тижні і далі темп атрофії зменшується (Lu et al.). М'язові волокна втрачають до 25% своєї товщини, і розподіл волокон за діаметром зміщується у бік "тонких" волокон (Bongers et al.). У власних дослідженнях ми частково підтверджуємо відомі дані, так як на термін 8 тижнів після пошкодження сідничного нерву було виявлено значний ступінь атрофії м'язу з появою нетипової для м'язів жирової тканини. Очевидно, що ці зміни першочергово є наслідком атрофії. Значущість "тонких" м'язових волокон (додатково містять ядра у центральному положенні волокна) у тривало денервованих м'язах залишається предметом дискусій. Біофізичні та метаболічні властивості цих волокон залишаються не встановленими, але припускається, що такі волокна є незрілими, новоутвореними. Вважається, що реіннервація є обов'язковою умовою і активуючим фактором для відновлення м'язових волокон, а так і морфометричних розмірів і функцій м'язу. Відомо також, що надмірне утворення рубцевої тканини і внутрішньо-м'язового жиру пригнічує повну регенерацію м'язової тканини і негативно позначається на функції м'яза.

Основним морфологічним проявом атрофії м'язового волокна є зменшення його товщини, що в нашому дослідженні оцінено за діаметром волокон та їх відносним розподілом у досліджених зразках м'язів. Результати роботи показують, що як відсоток фіброзних змін, так і атрофічних м'язових волокон менший після введення клітин аспірату кісткового мозку через 7 тижнів після денервації, тоді як раннє введення стимулювало колагеногенез. Хоча дані кількості м'язових волокон на 8 тижні у 2 і 3 групах можуть свідчити про затримку атрофії м'язу на ранніх



термінах введення клітин. Очевидно, що третій термін спостереженням (16 тижнів) є вирішальним і в кінцевому рахунку на основі співставлення морфології м'язу, результатів морфометрії і біохімічних даних відтермінований спосіб введення можна розглядати як потенційно сприятливим. Ми не перші, хто виявив подібну залежність між рівнем фіброзу і введення клітин кісткового мозку. Liu X, et al описали значне посилення фіброзу та запалення м'язів при контузійній травмі м'язів. Трансплантація мезенхімальних клітин викликала інфільтрацію лейкоцитів та макрофагів, збільшила рівень запальних цитокінів і хемокінів, матриксних металопротеїназ і окислювальний стрес у м'язах, тобто процесів, які пов'язані з запальним пошкодженням м'язів (X. Liu et al.). Введення клітин аспірату безпосередньо після травми нерву характеризувалось посиленням фіброзу, тоді як введення клітин через 7 тижнів після денервації не мало такого наслідку. Але слід зважати на те, що опорною точкою у досліджах є термін після травми нерву, тоді як часова різниця між введення клітин у групі 2 і 3 становить 7 тижнів. Ми не виключаємо, що у майбутньому фіброз міг зрости, тому зважаємо на погрішність цієї оцінки, але загалом введення клітин аспірату кісткового мозку посилювало фіброз.

Динаміку атрофії м'яза можна оцінити не тільки морфологічними методами, хоча зміни структури є найбільш доказовим показником. Травма, запалення і ішемія м'яза позначається на антиоксидантній системі захисту м'яза. Ферментативна система, як і у інших типах тканин, реалізується кількома шляхами (Ebert et al.). Наприклад, СОД і каталаза нейтралізують супероксид і гідропероксид, глутатіонпероксидаза каталізує відновлення гідроперексидів ліпідів у відповідні спирти і відновлення пероксиду водню до води, а глутатіонредуктаза відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону до його сульфгідрильної форми. Усі ці процеси спрямовані на утилізацію вільних радикалів і відновлення ендogenous антиоксиданта глутатіона, що в цілому реалізує антиоксидантний захист клітин (Sendhilvadivu). У цій роботі ми аналізували зміни активності ферментів, як прояв відповіді м'язів на денервацію та введення клітин аспірату кісткового мозку. Ми

виявили, що рівень ТБК, як продукту пероксидації ліпідів, проградієнтно зростає у всі терміни. Після введення клітин аспірату кісткового мозку їх рівень зменшився, що можна оцінити як прояв їх утилізації, так і пригнічення утворення. У відповідь на рівень ТБК-реагуючих продуктів зросла активність каталази, оскільки у відповідь на окисний стрес активується антиоксидантна система. При цьому захисні механізми цієї системи у більшій мірі проявились у третій групі. Ці результати слід враховувати при застосуванні клітин аспірату кісткового мозку у регенеративній медицині та травматології.

#### **Публікації до розділу 8:**

Lysak, A., Savosko, S., Strafun, S., Utko, N., Makarenko, O. (2022). Effect of bone marrow aspirate in denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Wiadomości Lekarskie Medical Advances*, 75(3), 634-640. doi: 10.36740/WLek202203112.

## ВИСНОВКИ

1. Пошкодження сідничного нерву призводить до атрофії м'язової тканини, яка частково сповільнюється після відстроченого введення аспірату кісткового мозку.

2. Застосування аспірату кісткового мозку опосередковано стимулює регенерацію хірургічно відновленого сідничного нерву, збільшуючи щільність регенерації нервових волокон та їх мієлінізацію.

3. Введення аспірату кісткового мозку у цільові м'язи під час оперативного втручання та на ранніх етапах реіннервації – сприяло зменшенню клінічних проявів денервації кінцівки таких як: набряк м'язів, наявність трофічних виразок, ознак аутофагії частин кінцівки та ін.

4. Введення аспірату кісткового мозку у цільові м'язи під час оперативного втручання та на ранніх етапах реіннервації сприяло покращенню реіннерваційних процесів у м'язах, та проявлялось реєстрацією більшої кількості потенціалів рухових одиниць. В той же час суттєво не впливала на їх параметри (тривалість, амплітуда та форма).

5. Відстрочене введення аспірату кісткового мозку достовірно ( $p < 0,05$ ) сприяло зменшенню набряку денервованих цільових м'язів кінцівки за даними комп'ютерної та магнітно-резонансної томографії. Встановлено що інтенсивність МР-сигналу в режимі T1 в групі де не виконували введення аспірату кісткового мозку достовірно ( $p < 0,05$ ) більша що може свідчити про процеси ущільнення м'язової тканини.

6. На основі одержаних морфологічних результатів сформульовано гіпотезу про виникнення у денервованих м'язах балансу між процесами регенерації та гіпотрофії, порушення цього балансу за рахунок виснаження регенеративного потенціалу м'яза призводить до атрофії м'язових волокон. Передбачається, що дія клітин аспірату кісткового мозку може пролонгувати стан рівноваги між регенерацією та гіпотрофією денервованого м'язу.

7. Атрофія цільових м'язів характеризувалась різким підвищенням рівня продуктів пероксидації ліпідів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою на 12 і 16 тижні та активності каталази на 12 тижні. Ці зміни біохімічних показників частково нормалізувались після застосування аспірату кісткового мозку, більшою мірою при відстроченому введенні.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Abbas, Ozan Luay, et al. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation Enhances Nerve Regeneration in a Rat Model of Hindlimb Replantation." *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 143, no. 4, 2019, pp. 758e–68e, <https://doi.org/10.1097/prs.00000000000005412>.
- Agata, Nobuhide, et al. "Repetitive Stretch Suppresses Denervation-Induced Atrophy of Soleus Muscle in Rats." *Muscle & Nerve*, vol. 39, no. 4, 2009, pp. 456–62, <https://doi.org/10.1002/mus.21103>.
- Ashley, Zoe, Stanley Salmons, et al. "Effects of Chronic Electrical Stimulation on Long-Term Denervated Muscles of the Rabbit Hind Limb." *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, vol. 28, no. 4–5, 2007, pp. 203–17, <https://doi.org/10.1007/s10974-007-9119-4>.
- Ashley, Zoe, Hazel Sutherland, et al. "Therapeutic Stimulation of Denervated Muscles: The Influence of Pattern." *Muscle & Nerve*, vol. 38, no. 1, 2008, pp. 875–86, <https://doi.org/10.1002/mus.21020>.
- Asplund, Maria, et al. "Incidence of Traumatic Peripheral Nerve Injuries and Amputations in Sweden between 1998 and 2006." *Neuroepidemiology*, vol. 32, no. 3, 2009, pp. 217–28, <https://doi.org/10.1159/000197900>.
- Bademoğlu, Gülten, et al. "The Effects of Pulsed Electromagnetic Field on Experimentally Induced Sciatic Nerve Injury in Rats." *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol. 40, no. 3, 2021, pp. 408–19, <https://doi.org/10.1080/15368378.2021.1907403>.
- Balice-Gordon, Rita J. "Schwann Cells: Dynamic Roles at the Neuromuscular Junction." *Current Biology*, vol. 6, no. 9, Sept. 1996, pp. 1054–56, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70662-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70662-3).
- Bass, A., et al. *The Denervated Muscle*. Springer, 1962.
- Bekelis, Kimon, et al. "Falls and Peripheral Nerve Injuries: An Age-Dependent Relationship." *Journal of Neurosurgery*, vol. 123, no. 5, Nov. 2015, pp. 1223–29, <https://doi.org/10.3171/2014.11.JNS142111>.
- Belsh, Jerry M. "Denervation." *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Elsevier, 2003, pp. 851–53, <https://doi.org/10.1016/B0-12-226870-9/00887-X>.

- Birch, R., et al. "Nerve Injuries Sustained during Warfare." *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, vol. 94-B, no. 4, 2012, pp. 523–28, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.94b4.28483>.
- . "Nerve Injuries Sustained during Warfare." *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, vol. 94-B, no. 4, 2012, pp. 529–35, <https://doi.org/10.1302/0301-620x.94b4.28488>.
- Birch, Rolfe. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*. Springer, 2011.
- Bongers, Kale S., et al. "Skeletal Muscle Denervation Causes Skeletal Muscle Atrophy through a Pathway That Involves Both Gadd45a and HDAC4." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 305, no. 7, Oct. 2013, pp. E907–15, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00380.2013>.
- Bowden, R. E. M., and E. Gutmann. "Denervation and Re-Innervation of Human Voluntary Muscle." *Brain*, vol. 67, no. 4, 1944, pp. 273–313, <https://doi.org/10.1093/brain/67.4.273>.
- Bozkurt, Ahmet, et al. "The Role of Microstructured and Interconnected Pore Channels in a Collagen-Based Nerve Guide on Axonal Regeneration in Peripheral Nerves." *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, Feb. 2012, pp. 1363–75, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.069>.
- BRAGA-SILVA, J., et al. "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)*, vol. 33, no. 4, Aug. 2008, pp. 488–93, <https://doi.org/10.1177/1753193408090401>.
- Brown, Kate V, et al. "Management of Conflict Injuries to the Upper Limb. Part 1: Assessment and Early Surgical Care." *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, vol. 47, no. 7, 2022, pp. 687–97, <https://doi.org/10.1177/17531934221098916>.
- Carlson, Bruce M. "The Biology of Long-Term Denervated Skeletal Muscle." *European Journal of Translational Myology*, vol. 24, no. 1, Mar. 2014, <https://doi.org/10.4081/ejtm.2014.3293>.
- Carlson, Bruce M. "The Biology of Long-Term Denervated Skeletal Muscle." *European Journal of Translational Myology*, vol. 24, no. 1, 2014, <https://doi.org/10.4081/bam.2014.1.5>.
- Castillo-Galván ML, Maximiliano Martínez-Ruiz F, de la Garza-Castro Ó, et al. "Study of Peripheral Nerve Injury in Trauma Patients." *Gac Med Mex.*, vol. 150, no. 6, 2014, pp. 527–32.
- Chen, Linlin, et al. "Drugs for the Treatment of Muscle Atrophy." *Background and Management of Muscular Atrophy*, IntechOpen, 2021, <https://doi.org/10.5772/intechopen.93503>.

- Chen, Shujie, et al. "Gut Microbiota in Muscular Atrophy Development, Progression, and Treatment: New Therapeutic Targets and Opportunities." *Innovation (Cambridge (Mass.))*, vol. 4, no. 5, July 2023, p. 100479, <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100479>.
- Connor, S. E. J., et al. "Imaging of Muscular Denervation Secondary to Motor Cranial Nerve Dysfunction." *Clinical Radiology*, vol. 61, no. 8, Aug. 2006, pp. 659–69, <https://doi.org/10.1016/j.crad.2006.04.003>.
- Corfas, Gabriel, et al. "Mechanisms and Roles of Axon-Schwann Cell Interactions." *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 42, Oct. 2004, pp. 9250–60, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3649-04.2004>.
- Coste, Christine Azevedo, et al. "Activating Effective Functional Hand Movements in Individuals with Complete Tetraplegia through Neural Stimulation." *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, Oct. 2022, p. 16189, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19906-x>.
- Cuevas, Pedro, et al. "Bone Marrow Stromal Cell Implantation for Peripheral Nerve Repair." *Neurological Research*, vol. 26, no. 2, Mar. 2004, pp. 230–32, <https://doi.org/10.1179/016164104225013897>.
- Dahlin, Lars B., and Mikael Wiberg. "Nerve Injuries of the Upper Extremity and Hand." *EFORT Open Reviews*, vol. 2, no. 5, May 2017, pp. 158–70, <https://doi.org/10.1302/2058-5241.2.160071>.
- Daniel, Bassem W., et al. "Supercharge End-to-Side Sensory Transfer to A Long Nerve Graft to Enhance Motor Regeneration in A Brachial Plexus Model—An Experimental Rat Study." *Journal of Reconstructive Microsurgery*, vol. 39, no. 06, 2022, pp. 435–43, <https://doi.org/10.1055/s-0042-1758186>.
- Daoutis, Nicholas K., et al. "Microsurgical Reconstruction of Large Nerve Defects Using Autologous Nerve Grafts." *Microsurgery*, vol. 15, no. 7, Jan. 1994, pp. 502–05, <https://doi.org/10.1002/micr.1920150713>.
- Davidge, Kristen M., et al. "The Supercharge End-to-Side Anterior Interosseous-to-Ulnar Motor Nerve Transfer for Restoring Intrinsic Function." *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 136, no. 3, 2015, pp. 344e–52e, <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000001514>.
- de Santana Chagas, Alessandra Carolina, et al. "Physical Therapeutic Treatment for Traumatic Brachial Plexus Injury in Adults: A Scoping Review." *PM&R*, vol. 14, no. 1, 2021, pp. 120–50, <https://doi.org/10.1002/pmrj.12566>.

- Di Filippo, Ester Sara, et al. "Neuromuscular Electrical Stimulation Improves Skeletal Muscle Regeneration through Satellite Cell Fusion with Myofibers in Healthy Elderly Subjects." *Journal of Applied Physiology*, vol. 123, no. 3, 2017, pp. 501–12, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00855.2016>.
- Dow, Douglas E., et al. "Number of Contractions to Maintain Mass and Force of a Denervated Rat Muscle." *Muscle & Nerve*, vol. 30, no. 1, 2004, pp. 77–86, <https://doi.org/10.1002/mus.20054>.
- Ebert, Scott M., et al. "Stress-Induced Skeletal Muscle Gadd45a Expression Reprograms Myonuclei and Causes Muscle Atrophy." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 33, Aug. 2012, pp. 27290–301, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374777>.
- Farjah, Gholam Hossein, et al. "The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Recovery of Skeletal Muscle after Neurotization Surgery in Rat." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 21, no. 3, Mar. 2018, pp. 236–43.
- Fouré, Alexandre, et al. "Time Course of Central and Peripheral Alterations after Isometric Neuromuscular Electrical Stimulation-Induced Muscle Damage." *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, Sept. 2014, p. e107298, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107298>.
- Fu, Susan Y., and Tessa Gordon. "The Cellular and Molecular Basis of Peripheral Nerve Regeneration." *Molecular Neurobiology*, vol. 14, no. 1–2, Feb. 1997, pp. 67–116, <https://doi.org/10.1007/BF02740621>.
- Fu, SY, and T. Gordon. "Contributing Factors to Poor Functional Recovery after Delayed Nerve Repair: Prolonged Axotomy." *The Journal of Neuroscience*, vol. 15, no. 5, May 1995, pp. 3876–85, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03876.1995>.
- Garg, Varun, et al. "Distal Nerve Transfer to Restore Wrist and Finger Extension – A Systematic Review." *The Journal of Hand Surgery (Asian-Pacific Volume)*, vol. 27, no. 06, 2022, pp. 1000–07, <https://doi.org/10.1142/s2424835522500953>.
- Gigo-Benato, Davilene, et al. "Electrical Stimulation Impairs Early Functional Recovery and Accentuates Skeletal Muscle Atrophy after Sciatic Nerve Crush Injury in Rats." *Muscle & Nerve*, vol. 41, no. 5, 2010, pp. 685–93, <https://doi.org/10.1002/mus.21549>.



- Goel, Rohit Kumar, et al. "Effect of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells on Nerve Regeneration in the Transection Model of the Rat Sciatic Nerve." *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 16, no. 9, Sept. 2009, pp. 1211–17, <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.01.031>.
- Goodpaster, Bret H., et al. "Skeletal Muscle Attenuation Determined by Computed Tomography Is Associated with Skeletal Muscle Lipid Content." *Journal of Applied Physiology*, vol. 89, no. 1, July 2000, pp. 104–10, <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.104>.
- Gordon, Tessa. "Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 22, Nov. 2020, p. 8652, <https://doi.org/10.3390/ijms21228652>.
- . "Reinnervated Muscle Fiber Type-Grouping-Inevitable?" *Oncotarget*, vol. 8, no. 11, Mar. 2017, pp. 17410–11, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15757>.
- . "The Basis for Diminished Functional Recovery after Delayed Peripheral Nerve Repair." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 31, no. 14, Apr. 2011, pp. 5325–34, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6156-10.2011>.
- Gordon, Tessa, and Arthur W. English. "Strategies to Promote Peripheral Nerve Regeneration: Electrical Stimulation and/or Exercise." *European Journal of Neuroscience*, vol. 43, no. 3, Feb. 2016, pp. 336–50, <https://doi.org/10.1111/ejn.13005>.
- Gordon, Tessa, and Neil Tyreman. "Electrical Stimulation to Promote Muscle and Motor Unit Force and Endurance after Spinal Cord Injury." *The Journal of Physiology*, vol. 601, no. 8, 2023, pp. 1449–66, <https://doi.org/10.1113/jp283972>.
- Graham, Zachary A., et al. "Mechanisms of Exercise as a Preventative Measure to Muscle Wasting." *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2021/05/05, vol. 321, no. 1, July 2021, pp. C40–57, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00056.2021>.
- Gregory, Chris M., and C. Scott Bickel. "Recruitment Patterns in Human Skeletal Muscle During Electrical Stimulation." *Physical Therapy*, vol. 85, no. 4, 2005, pp. 358–64, <https://doi.org/10.1093/ptj/85.4.358>.
- Grinsell, D., and C. P. Keating. "Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies." *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014, pp. 1–13, <https://doi.org/10.1155/2014/698256>.

- Guo, Liang, et al. "Stretchable Polymeric Multielectrode Array for Conformal Neural Interfacing." *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 2013/10/22, vol. 26, no. 9, Mar. 2014, pp. 1427–33, <https://doi.org/10.1002/adma.201304140>.
- Gutmann, E., and J. Zelena. "Comparative Studies of Muscle Atrophy." *Babakova Sbirka*, vol. 16, 1959, p. 147.
- Gutmann, E., and J. Zelená. "Morphological Changes in the Denervated Muscle." *The Denervated Muscle*, Springer US, 1962, pp. 57–102, [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4854-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4854-0_3).
- Habib, Owais, et al. "Peripheral Nerve Injuries- An Analysis of 75 Cases." *JMS SKIMS*, vol. 13, no. 1, June 2010, pp. 7–10, <https://doi.org/10.33883/jms.v13i1.36>.
- Hadj-Saïd, Wahiba, et al. "Effect of Locomotor Training on Muscle Performance in the Context of Nerve-Muscle Communication Dysfunction." *Muscle & Nerve*, vol. 45, no. 4, 2012, pp. 567–77, <https://doi.org/10.1002/mus.22332>.
- Hanwright, Philip J., et al. "Sustained IGF-1 Delivery Ameliorates Effects of Chronic Denervation and Improves Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury and Repair." *Biomaterials*, vol. 280, 2022, p. 121244, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121244>.
- Head, Linden K., et al. "Evaluation of Intrinsic Hand Musculature Reinnervation Following Supercharge End-to-Side Anterior Interosseous-to-Ulnar Motor Nerve Transfer." *Plastic & Reconstructive Surgery*, vol. 146, no. 1, 2020, pp. 128–32, <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000006903>.
- Herrera-Rincon, Celia, et al. "Can We Promote Neural Regeneration through Microbiota-Targeted Strategies? Introducing the New Concept of Neurobiotics." *Neural Regeneration Research*, vol. 17, no. 9, Sept. 2022, pp. 1965–66, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.335149>.
- Hogendoorn, S., et al. "Local Injection of Autologous Bone Marrow Cells to Regenerate Muscle in Patients with Traumatic Brachial Plexus Injury: A Pilot Study." *Bone & Joint Research*, vol. 3, no. 2, Feb. 2014, pp. 38–47, <https://doi.org/10.1302/2046-3758.32.2000229>.
- Höke, Ahmet. "Mechanisms of Disease: What Factors Limit the Success of Peripheral Nerve Regeneration in Humans?" *Nature Clinical Practice Neurology*, vol. 2, no. 8, 2006, pp. 448–54, <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0262>.
- Holl, Nathalie, et al. "Diffusion-Weighted MRI of Denervated Muscle: A Clinical and Experimental Study." *Skeletal Radiology*, vol. 37, no. 12, Dec. 2008, pp. 1111–17, <https://doi.org/10.1007/s00256-008-0552-2>.

- Huang, Li, et al. "Potential Therapeutic Strategies for Skeletal Muscle Atrophy." *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, p. 44, <https://doi.org/10.3390/antiox12010044>.
- Huang, Xinying, et al. "Denervation-Related Neuromuscular Junction Changes: From Degeneration to Regeneration." *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 14, Feb. 2022, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.810919>.
- Isaacs, Jonathan. "Major Peripheral Nerve Injuries." *Hand Clinics*, vol. 29, no. 3, Aug. 2013, pp. 371–82, <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.006>.
- . "Reverse End-to-Side (Supercharging) Nerve Transfer: Conceptualization, Validation, and Translation." *Hand (New York, N.Y.)*, 2021/02/03, vol. 17, no. 6, Nov. 2022, pp. 1017–23, <https://doi.org/10.1177/1558944720988076>.
- Jabeen, Shamsa, and Javed Iqbal Qazi. "Oral Administration of a Locally Isolated Lactobacillus Rhamnosus (NR\_113332.1) Improves Regeneration of Extensor Digitorum Longus Muscle in Mice." *Nutrition*, vol. 114, 2023, p. 112110, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112110>.
- Jonsson, Samuel, et al. "Effect of Delayed Peripheral Nerve Repair on Nerve Regeneration, Schwann Cell Function and Target Muscle Recovery." *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Feb. 2013, p. e56484, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056484>.
- Juckett, Luke, et al. "The Effect of Electrical Stimulation on Nerve Regeneration Following Peripheral Nerve Injury." *Biomolecules*, vol. 12, no. 12, Dec. 2022, p. 1856, <https://doi.org/10.3390/biom12121856>.
- KALLIO, P. K., et al. "The Results of Secondary Microsurgical Repair of Radial Nerve in 33 Patients." *Journal of Hand Surgery*, vol. 18, no. 3, June 1993, pp. 320–22, [https://doi.org/10.1016/0266-7681\(93\)90052-H](https://doi.org/10.1016/0266-7681(93)90052-H).
- Kamath, S., et al. "MRI Appearance of Muscle Denervation." *Skeletal Radiology*, vol. 37, no. 5, May 2008, pp. 397–404, <https://doi.org/10.1007/s00256-007-0409-0>.
- Kern, Helmut, et al. "Long-Term Denervation in Humans Causes Degeneration of Both Contractile and Excitation-Contraction Coupling Apparatus, Which Is Reversible by Functional Electrical Stimulation (FES): A Role for Myofiber Regeneration?" *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 63, no. 9, 2004, pp. 919–31, <https://doi.org/10.1093/jnen/63.9.919>.
- Keynes, Richard D., et al. *Nerve and Muscle (4th Edition)*. Cambridge University Press, 2011.

- Khanna, A., et al. "The Effects of LIPUS on Soft-Tissue Healing: A Review of Literature." *British Medical Bulletin*, vol. 89, no. 1, 2008, pp. 169–82, <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn040>.
- Khodabukus, Alastair, et al. "In Vitro Tissue-Engineered Skeletal Muscle Models for Studying Muscle Physiology and Disease." *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, no. 15, Aug. 2018, <https://doi.org/10.1002/adhm.201701498>.
- Kikuchi, Yoshito, et al. "MR Imaging in the Diagnosis of Denervated and Reinnervated Skeletal Muscles: Experimental Study in Rats." *Radiology*, vol. 229, no. 3, Dec. 2003, pp. 861–67, <https://doi.org/10.1148/radiol.2293020904>.
- Kingham, Paul J., and Giorgio Terenghi. "Bioengineered Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation." *Journal of Anatomy*, vol. 209, no. 4, Oct. 2006, pp. 511–26, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00623.x>.
- Kostrominova, Tatiana Y. "Skeletal Muscle Denervation: Past, Present and Future." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 14, July 2022, p. 7489, <https://doi.org/10.3390/ijms23147489>.
- Krarup, Christian, et al. "Factors That Influence Peripheral Nerve Regeneration: An Electrophysiological Study of the Monkey Median Nerve." *Annals of Neurology*, vol. 51, no. 1, Jan. 2002, pp. 69–81, <https://doi.org/10.1002/ana.10054>.
- Kuffler, Damien P., and Christian Foy. "Restoration of Neurological Function Following Peripheral Nerve Trauma." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 5, Mar. 2020, p. 1808, <https://doi.org/10.3390/ijms21051808>.
- Küllmer, K., et al. "Changes of Sonographic, Magnetic Resonance Tomographic, Electromyographic, and Histopathologic Findings within a 2-Month Period of Examinations after Experimental Muscle Denervation." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, vol. 117, no. 4–5, 1998, pp. 228–34, <https://doi.org/10.1007/s004020050234>.
- Kumar, Arachimani Anand, et al. "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 : Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, vol. 7, no. 4, Dec. 2009, pp. 241–48.
- Kurosaka, Mitsutoshi, et al. "IL-4 Signaling Promotes Myoblast Differentiation and Fusion by Enhancing the Expression of MyoD, Myogenin, and Myomerger." *Cells*, vol. 12, no. 9, Apr. 2023, p. 1284, <https://doi.org/10.3390/cells12091284>.

- Lad, Shivanand P., et al. "Trends in Median, Ulnar, Radial, and Brachio Plexus Nerve Injuries in the United States." *Neurosurgery*, vol. 66, no. 5, May 2010, pp. 953–60, <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000368545.83463.91>.
- Lee, Steve K., and Scott W. Wolfe. "Peripheral Nerve Injury and Repair." *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 8, no. 4, July 2000, pp. 243–52, <https://doi.org/10.5435/00124635-200007000-00005>.
- Levi-Montalcini, Rita. "Effects of Mouse Tumor Transplantation on the Nervous System." *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 55, no. 2, 1952, pp. 330–44, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26548.x>.
- Lienemann, Samuel, Mary J. Donahue, et al. "A Soft and Stretchable Multielectrode Cuff for Selective Peripheral Nerve Stimulation." *Advanced Materials Technologies*, vol. 8, no. 6, 2023, <https://doi.org/10.1002/admt.202201322>.
- Lienemann, Samuel, Johan Zötterman, et al. "Stretchable Gold Nanowire-Based Cuff Electrodes for Low-Voltage Peripheral Nerve Stimulation." *Journal of Neural Engineering*, vol. 18, no. 4, 2021, p. 045007, <https://doi.org/10.1088/1741-2552/abfebb>.
- Lin, Zichun, et al. "Application of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Tissue Resident Stem Cells: Potential for Ophthalmic Diseases." *Frontiers in Endocrinology*, vol. 14, Mar. 2023, p. 1153793, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1153793>.
- Liu, Wenxuan, et al. "Inducible Depletion of Adult Skeletal Muscle Stem Cells Impairs the Regeneration of Neuromuscular Junctions." *ELife*, vol. 4, Aug. 2015, <https://doi.org/10.7554/eLife.09221>.
- Liu, Xiaoguang, et al. "BMSC Transplantation Aggravates Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis and Impairs Skeletal Muscle Regeneration." *Frontiers in Physiology*, vol. 10, Feb. 2019, <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00087>.
- Lopez, Joseph, et al. "Growth Hormone Improves Nerve Regeneration, Muscle Re-Innervation, and Functional Outcomes After Chronic Denervation Injury." *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Feb. 2019, p. 3117, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39738-6>.
- Love, Flora M., et al. "Activity Alters Muscle Reinnervation and Terminal Sprouting by Reducing the Number of Schwann Cell Pathways That Grow to Link Synaptic Sites." *Journal of Neurobiology*, vol. 54, no. 4, Mar. 2003, pp. 566–76, <https://doi.org/10.1002/neu.10191>.

- Lu, Xiaomei, et al. "Modulation of HOXA9 after Skeletal Muscle Denervation and Reinnervation." *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 318, no. 6, June 2020, pp. C1154–65, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00055.2020>.
- Ly, Yonggang, et al. "Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Cell Viability, Proliferation and Neural Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Neural Crest Stem Cells." *Biotechnology Letters*, vol. 35, no. 12, 2013, pp. 2201–12, <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1313-4>.
- Lysak, Andrii, et al. "EFFECT OF BONE MARROW ASPIRATE IN DENERVATION-INDUCED SKELETAL MUSCLE ATROPHY." *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, vol. 75, no. 3, 2022, pp. 634–40.
- Machado, J. A., et al. "Stretch-Induced Nerve Injury: A Proposed Technique for the Study of Nerve Regeneration and Evaluation of the Influence of Gabapentin on This Model." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 46, no. 11, Oct. 2013, pp. 929–35, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132863>.
- Mackinnon, S. E. *Nerve Surgery*. Thieme, 2015.
- Mackinnon, S. E., and A. L. Dellon. "Nerve Repair and Nerve Grafts." *Surgery of the Peripheral Nerve*, Thieme, 1988.
- Maffiuletti, Nicola A., et al. "Clinical Use of Neuromuscular Electrical Stimulation for Neuromuscular Rehabilitation: What Are We Overlooking?" *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 99, no. 4, 2018, pp. 806–12, <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2017.10.028>.
- Magill, Christina K., et al. "Reinnervation of the Tibialis Anterior Following Sciatic Nerve Crush Injury: A Confocal Microscopic Study in Transgenic Mice." *Experimental Neurology*, 2007/06/14, vol. 207, no. 1, Sept. 2007, pp. 64–74, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.05.028>.
- Marques, Maria Julia, et al. "Terminal Schwann Cell Distribution at the Neuromuscular Junction of the Dystrophin-Deficient MDX Mice." *Braz. J. Morphol. Sci.*, vol. 23, no. 1, 2006, pp. 217–22.
- Mason, Chris, and Peter Dunnill. "A Brief Definition of Regenerative Medicine." *Regenerative Medicine*, vol. 3, no. 1, 2008, pp. 1–5, <https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1>.
- Maugeri, Grazia, et al. "The Role of Exercise on Peripheral Nerve Regeneration: From Animal Model to Clinical Application." *Heliyon*, vol. 7, no. 11, Oct. 2021, pp. e08281–e08281, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08281>.

- McAvoy, Malia, et al. "Flexible Multielectrode Array for Skeletal Muscle Conditioning, Acetylcholine Receptor Stabilization and Epimysial Recording After Critical Peripheral Nerve Injury." *Theranostics*, vol. 9, no. 23, Sept. 2019, pp. 7099–107, <https://doi.org/10.7150/thno.35436>.
- Menorca, Ron M. G., et al. "Nerve Physiology." *Hand Clinics*, vol. 29, no. 3, Aug. 2013, pp. 317–30, <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.002>.
- Messi, María Laura, et al. "Resistance Training Enhances Skeletal Muscle Innervation Without Modifying the Number of Satellite Cells or Their Myofiber Association in Obese Older Adults." *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 2015/10/07, vol. 71, no. 10, Oct. 2016, pp. 1273–80, <https://doi.org/10.1093/gerona/glv176>.
- Mezey, Éva, et al. "Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow." *Science*, vol. 290, no. 5497, 2000, pp. 1779–82, <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1779>.
- M.F, Griffin, et al. "Peripheral Nerve Injury: Principles for Repair and Regeneration." *The Open Orthopaedics Journal*, vol. 8, no. 1, June 2014, pp. 199–203, <https://doi.org/10.2174/1874325001408010199>.
- Muir, A. R., et al. "The Structure of the Satellite Cells in Skeletal Muscle." *Journal of Anatomy*, vol. 99, no. 3, July 1965, pp. 435–44.
- Murovic, Judith A. "UPPER-EXTREMITY PERIPHERAL NERVE INJURIES." *Neurosurgery*, vol. 65, no. 4, Oct. 2009, pp. A11–17, <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000339130.90379.89>.
- Ni, Lingmei, et al. "Electrical Stimulation Therapy for Peripheral Nerve Injury." *Frontiers in Neurology*, vol. 14, Feb. 2023, p. 1081458, <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1081458>.
- Nix, Wilfred A. "The Effect of Low-Frequency Electrical Stimulation on the Denervated Extensor Digitorum Longus Muscle of the Rabbit." *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 66, no. 5, 2009, pp. 521–28, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1982.tb03138.x>.
- Noble, James, et al. "Analysis of Upper and Lower Extremity Peripheral Nerve Injuries in a Population of Patients with Multiple Injuries." *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, vol. 45, no. 1, July 1998, pp. 116–22, <https://doi.org/10.1097/00005373-199807000-00025>.
- Novak, Christine B., et al. "Biomedical and Psychosocial Factors Associated with Disability After Peripheral Nerve Injury." *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, vol. 93, no. 10, May 2011, pp. 929–36, <https://doi.org/10.2106/JBJS.J.00110>.

- O'Brien, Michael. *Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System (5th Edition)*. Saunders, 2010.
- Otzel, Dana M., et al. "Pharmacologic Approaches to Prevent Skeletal Muscle Atrophy after Spinal Cord Injury." *Current Opinion in Pharmacology*, 2021/08/28, vol. 60, Oct. 2021, pp. 193–99, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.07.023>.
- Padovano, William M., et al. "Incidence of Nerve Injury After Extremity Trauma in the United States." *HAND*, vol. 17, no. 4, July 2022, pp. 615–23, <https://doi.org/10.1177/1558944720963895>.
- Park, Sang Jun, et al. "Neurogenesis Is Induced by Electrical Stimulation of Human Mesenchymal Stem Cells Co-Cultured With Mature Neuronal Cells." *Macromolecular Bioscience*, vol. 15, no. 11, 2015, pp. 1586–94, <https://doi.org/10.1002/mabi.201500115>.
- Park, So Young, et al. "The Scaffolding Protein, Grb2-Associated Binder-1, in Skeletal Muscles and Terminal Schwann Cells Regulates Postnatal Neuromuscular Synapse Maturation." *Experimental Neurobiology*, vol. 26, no. 3, June 2017, pp. 141–50, <https://doi.org/10.5607/en.2017.26.3.141>.
- Pellot-Cestero, Joel E., et al. "Implanted Electrodes for Functional Electrical Stimulation to Restore Upper and Lower Extremity Function: History and Future Directions." *Neurosurgery*, June 2023, <https://doi.org/10.1227/neu.0000000000002561>.
- Peng, Dong-Yi, et al. "Low-Intensity Pulsed Ultrasound for Regenerating Peripheral Nerves: Potential for Penile Nerve." *Asian Journal of Andrology*, vol. 22, no. 4, 2020, pp. 335–41, [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_95\\_19](https://doi.org/10.4103/aja.aja_95_19).
- Piccinini, Giulia, et al. "Efficacy of Electrical Stimulation of Denervated Muscle: A Multicenter, Double-blind, Randomized Clinical Trial." *Muscle & Nerve*, vol. 61, no. 6, 2020, pp. 773–78, <https://doi.org/10.1002/mus.26880>.
- Pinto Damo, Natália Lucília, et al. "Effects of Different Electrical Stimulation Currents and Phase Durations on Submaximal and Maximum Torque, Efficiency, and Discomfort: A Randomized Crossover Trial." *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 2021/03/26, vol. 25, no. 5, 2021, pp. 593–600, <https://doi.org/10.1016/j.bjpt.2021.03.001>.
- Polasek, Katharine H., et al. "Stimulation Stability and Selectivity of Chronically Implanted Multicontact Nerve Cuff Electrodes in the Human Upper Extremity." *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering : A Publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2009/09/22, vol. 17, no. 5, Oct. 2009, pp. 428–37, <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2009.2032603>.



- Porporato, Paolo E., et al. "Acylated and Unacylated Ghrelin Impair Skeletal Muscle Atrophy in Mice." *The Journal of Clinical Investigation*, 2013/01/02, vol. 123, no. 2, Feb. 2013, pp. 611–22, <https://doi.org/10.1172/JCI39920>.
- Post, René, et al. "Outcome Following Nerve Repair of High Isolated Clean Sharp Injuries of the Ulnar Nerve." *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, Oct. 2012, p. e47928, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047928>.
- Punga, Anna R., et al. "MuSK Levels Differ between Adult Skeletal Muscles and Influence Postsynaptic Plasticity." *European Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 5, 2011, pp. 890–98, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07569.x>.
- Rahiminezhad, Elham, et al. "A Randomized Controlled Clinical Trial of the Effects of Range of Motion Exercises and Massage on Muscle Strength in Critically Ill Patients." *BMC Sports Science, Medicine & Rehabilitation*, vol. 14, no. 1, May 2022, p. 96, <https://doi.org/10.1186/s13102-022-00489-z>.
- Reynolds, J. "Report upon the Electro-Physiological Researches of Dr. Duchenne." *The British and Foreign Medico-Chirurgical Review*, vol. 15, no. 29, Feb. 1855, pp. 138–51.
- Roberts, Darren C., et al. "Management of Conflict Injuries to the Upper Limb. Part 2: Reconstruction and Managing Complications." *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, vol. 47, no. 8, 2022, pp. 787–97, <https://doi.org/10.1177/17531934221105225>.
- Robinson, Lawrence R. "Traumatic Injury to Peripheral Nerves." *Muscle & Nerve*, vol. 23, no. 6, June 2000, pp. 863–73, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(200006\)23:6<863::AID-MUS4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(200006)23:6<863::AID-MUS4>3.0.CO;2-0).
- Rochkind, Shimon, et al. "Clinical Aspects of Ballistic Peripheral Nerve Injury: Shrapnel versus Gunshot." *Acta Neurochirurgica*, vol. 156, no. 8, 2014, pp. 1567–75, <https://doi.org/10.1007/s00701-014-2139-0>.
- Ruijs, Aleid C. J., et al. "Median and Ulnar Nerve Injuries: A Meta-Analysis of Predictors of Motor and Sensory Recovery after Modern Microsurgical Nerve Repair." *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 116, no. 2, Aug. 2005, pp. 484–94, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000172896.86594.07>.
- . "Median and Ulnar Nerve Injuries: A Meta-Analysis of Predictors of Motor and Sensory Recovery after Modern Microsurgical Nerve Repair." *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 116, no. 2, Aug. 2005, pp. 484–94, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000172896.86594.07>.

- Saito, Harukazu, and Lars B. Dahlin. "Expression of ATF3 and Axonal Outgrowth Are Impaired after Delayed Nerve Repair." *BMC Neuroscience*, vol. 9, Sept. 2008, p. 88, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-88>.
- Sakuma, Kunihiro, and Akihiko Yamaguchi. *Drugs of Muscle Wasting and Their Therapeutic Targets*. 2018, pp. 463–81, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_21).
- Sakuma, Miyuki, et al. "Lack of Motor Recovery after Prolonged Denervation of the Neuromuscular Junction Is Not Due to Regenerative Failure." *European Journal of Neuroscience*, vol. 43, no. 3, Feb. 2016, pp. 451–62, <https://doi.org/10.1111/ejn.13059>.
- Sallomi, D., et al. "Muscle Denervation Patterns in Upper Limb Nerve Injuries: MR Imaging Findings and Anatomic Basis." *American Journal of Roentgenology*, vol. 171, no. 3, Sept. 1998, pp. 779–84, <https://doi.org/10.2214/ajr.171.3.9725316>.
- Santana, André Junior, et al. "Sericin and swimming on histomorphometric parameters of denervated plantar muscle in Wistar rats." *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 2018/04/26, vol. 16, no. 1, 2018, pp. eAO4137–eAO4137, <https://doi.org/10.1590/s1679-45082018ao4137>.
- Sarhane, Karim A., et al. "Defining the Relative Impact of Muscle versus Schwann Cell Denervation on Functional Recovery after Delayed Nerve Repair." *Experimental Neurology*, vol. 339, 2021, p. 113650, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113650>.
- Saur, K., et al. "[Results of Reinnervation after Peripheral Nerve Repair by a Microsurgical Technique Used in 1996-1998]." *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca*, vol. 71, no. 5, 2004, pp. 297–302.
- Sendhilvadivu, M. "Impact of in Vivo Electrical Stimulation during Denervation Dis-Use Muscle Atrophy." *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 47, no. 10, Oct. 2009, pp. 839–42.
- Sene, Giovana Almeida Leitão, et al. "Effects of Laser Therapy in Peripheral Nerve Regeneration." *Acta Ortopedica Brasileira*, vol. 21, no. 5, 2013, pp. 266–70, <https://doi.org/10.1590/S1413-78522013000500005>.
- Shen, Yuntian, et al. "Microarray Analysis of Gene Expression Provides New Insights Into Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy." *Frontiers in Physiology*, vol. 10, Oct. 2019, p. 1298, <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01298>.

- Shiyang, Wang, et al. "Passive Training Improves the Recovery of Skeletal Muscle Structure and Function in Rats with Denervated Muscle Atrophy." *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, vol. 24, no. 32, 2020, pp. 5138–44.
- Slavin, Benjamin R., et al. "Insulin-Like Growth Factor-1: A Promising Therapeutic Target for Peripheral Nerve Injury." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, June 2021, p. 695850, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.695850>.
- Srinivasan, Shriya, et al. "Polyimide Electrode-Based Electrical Stimulation Impedes Early Stage Muscle Graft Regeneration." *Frontiers in Neurology*, vol. 10, Mar. 2019, p. 252, <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00252>.
- Stoll, Guido, et al. *Imaging of the Peripheral Nervous System*. 2013, pp. 137–53, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00008-4>.
- Sugiura, Yoshie, and Weichun Lin. "Neuron–Glia Interactions: The Roles of Schwann Cells in Neuromuscular Synapse Formation and Function." *Bioscience Reports*, vol. 31, no. 5, Oct. 2011, pp. 295–302, <https://doi.org/10.1042/BSR20100107>.
- Sulaiman, Wale, and Tessa Gordon. "Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and Functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application." *Ochsner Journal*, vol. 13, no. 1, 2013, pp. 100–08.
- Sumarwoto, Tito, et al. "Prospect of Stem Cells as Promising Therapy for Brachial Plexus Injury: A Systematic Review." *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*, vol. 15, June 2022, pp. 29–42, <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S363415>.
- Sunderland, S. *Nerves and Nerve Injuries*. Churchill Livingstone, 1978.
- Tan, Yan, et al. "Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulates Proliferation of Stem/Progenitor Cells: What We Need to Know to Translate Basic Science Research into Clinical Applications." *Asian Journal of Andrology*, vol. 23, no. 6, 2021, pp. 602–10, [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_25\\_21](https://doi.org/10.4103/aja.aja_25_21).
- Tanaka, Shoji, et al. "Effect of Exercise Training after Partial Denervation in Rat Soleus Muscles." *Journal of Physical Therapy Science*, vol. 17, no. 2, 2005, pp. 97–101, <https://doi.org/10.1589/jpts.17.97>.
- Tavakoli, Sahar, et al. "Transplantation-Based Screen Identifies Inducers of Muscle Progenitor Cell Engraftment across Vertebrate Species." *Cell Reports*, vol. 42, no. 4, 2023, p. 112365, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112365>.

- Tayebi, Seyed Morteza, et al. "The Effects of High-Intensity Interval Training on Skeletal Muscle Morphological Changes and Denervation Gene Expression of Aged Rats." *Montenegrin Journal of Sports Science and Medicine*, vol. 8, no. 2, Sept. 2019, pp. 39–45, <https://doi.org/10.26773/mjssm.190906>.
- Thomas, Christine K., et al. "Embryonic Cord Transplants in Peripheral Nerve Restore Skeletal Muscle Function." *Journal of Neurophysiology*, vol. 84, no. 1, July 2000, pp. 591–95, <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.591>.
- Tigra, Wafa, et al. "Selective Neural Electrical Stimulation Restores Hand and Forearm Movements in Individuals with Complete Tetraplegia." *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*, vol. 17, no. 1, May 2020, p. 66, <https://doi.org/10.1186/s12984-020-00676-4>.
- Tuffaha, Sami H., et al. "Therapeutic Augmentation of the Growth Hormone Axis to Improve Outcomes Following Peripheral Nerve Injury." *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 20, no. 10, 2016, pp. 1259–65, <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1188079>.
- van de Sande, Michiel A. J., et al. "Quantitative Assessment of Fatty Degeneration in Rotator Cuff Muscles Determined With Computed Tomography." *Investigative Radiology*, vol. 40, no. 5, May 2005, pp. 313–19, <https://doi.org/10.1097/01.rli.0000160014.16577.86>.
- Vannucci, Bianca, et al. "What Is Normal? Neuromuscular Junction Reinnervation after Nerve Injury." *Muscle & Nerve*, 2019/08/23, vol. 60, no. 5, Nov. 2019, pp. 604–12, <https://doi.org/10.1002/mus.26654>.
- Volk, Gerd Fabian, et al. "Quantitative Ultrasonography of Facial Muscles in Patients with Chronic Facial Palsy." *Muscle & Nerve*, vol. 50, no. 3, Sept. 2014, pp. 358–65, <https://doi.org/10.1002/mus.24154>.
- von Guionneau, Nicholas, et al. "Mechanisms and Outcomes of the Supercharged End-to-Side Nerve Transfer: A Review of Preclinical and Clinical Studies." *Journal of Neurosurgery*, vol. 134, no. 5, 2021, pp. 1590–98, <https://doi.org/10.3171/2020.3.jns191429>.
- von Roth, Philipp, et al. "Improvement of Contraction Force in Injured Skeletal Muscle after Autologous Mesenchymal Stroma Cell Transplantation Is Accompanied by Slow to Fast Fiber Type Shift." *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 2013/10/27, vol. 40, no. 6, Dec. 2013, pp. 425–30, <https://doi.org/10.1159/000354127>.

- Wall, EJ, et al. "Experimental Stretch Neuropathy. Changes in Nerve Conduction under Tension." *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, vol. 74-B, no. 1, Jan. 1992, pp. 126–29, <https://doi.org/10.1302/0301-620X.74B1.1732240>.
- Wan, Qiuxian, et al. "Aspirin Alleviates Denervation-Induced Muscle Atrophy via Regulating the Sirt1/PGC-1 $\alpha$  Axis and STAT3 Signaling." *Annals of Translational Medicine*, vol. 8, no. 22, Nov. 2020, p. 1524, <https://doi.org/10.21037/atm-20-5460>.
- Wang, Eugene, et al. "Optimal Timing for Repair of Peripheral Nerve Injuries." *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, vol. 83, no. 5, Nov. 2017, pp. 875–81, <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001570>.
- Wang, Mark L., et al. "Peripheral Nerve Injury, Scarring, and Recovery." *Connective Tissue Research*, vol. 60, no. 1, Jan. 2019, pp. 3–9, <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1489381>.
- Wang, Yumin, et al. "Passive Repetitive Stretching Is Associated with Greater Muscle Mass and Cross-Sectional Area in the Sarcopenic Muscle." *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, July 2021, p. 15302, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94709-0>.
- Wechsler, W., and H. Hager. "Elektronenmikroskopische Befunde Am Atrophischen Quergestreiften Skelettmuskel Der Ratte Nach Nervdurchtrennung." *Die Naturwissenschaften*, vol. 47, no. 8, 1960, pp. 185–86, <https://doi.org/10.1007/bf00639759>.
- West, G. Alexander, et al. "Magnetic Resonance Imaging Signal Changes in Denervated Muscles after Peripheral Nerve Injury." *Neurosurgery*, vol. 35, no. 6, Dec. 1994, pp. 1077–86, <https://doi.org/10.1227/00006123-199412000-00010>.
- Willand, Michael P. "Electrical Stimulation Enhances Reinnervation after Nerve Injury." *European Journal of Translational Myology*, vol. 25, no. 4, Aug. 2015, p. 243, <https://doi.org/10.4081/ejtm.2015.5243>.
- Willmott, Andrew D., et al. "Fibrillation Potential Onset in Peripheral Nerve Injury." *Muscle & Nerve*, vol. 46, no. 3, 2012, pp. 332–40, <https://doi.org/10.1002/mus.23310>.
- Wong, Alvin, and Jason H. Pomerantz. "The Role of Muscle Stem Cells in Regeneration and Recovery after Denervation: A Review." *Plastic & Reconstructive Surgery*, vol. 143, no. 3, 2019, pp. 779–88, <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000005370>.
- Wu, Haitao, et al. "To Build a Synapse: Signaling Pathways in Neuromuscular Junction Assembly." *Development*, vol. 137, no. 7, Apr. 2010, pp. 1017–33, <https://doi.org/10.1242/dev.038711>.

- Yang, Chun-Yi, et al. "External Magnetic Field Non-Invasively Stimulates Spinal Cord Regeneration in Rat via a Magnetic-Responsive Aligned Fibrin Hydrogel." *Biofabrication*, vol. 15, no. 3, 2023, p. 035022, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/acdbec>.
- Yin, Lin, et al. "Skeletal Muscle Atrophy: From Mechanisms to Treatments." *Pharmacological Research*, vol. 172, 2021, p. 105807, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>.
- Zavala, Abraham, et al. "Supercharge End-to-Side Motor Transfer to a Long Nerve Graft to Enhance Motor Regeneration: An Experimental Rat Study." *Plastic & Reconstructive Surgery*, vol. 152, no. 1, 2023, pp. 85e–95e, <https://doi.org/10.1097/prs.00000000000010114>.
- Zelada, Diego, et al. "Motor Function Recovery: Deciphering a Regenerative Niche at the Neuromuscular Synapse." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2020/12/17, vol. 96, no. 2, Apr. 2021, pp. 752–66, <https://doi.org/10.1111/brv.12675>.
- Zhang, Qiu-Wan, et al. "Exercise Promotes Axon Regeneration of Newborn Striatonigral and Corticonigral Projection Neurons in Rats after Ischemic Stroke." *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, Nov. 2013, p. e80139, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080139>.
- Zhu, Yaqiong, et al. "Evaluation of the Crushed Sciatic Nerve and Denervated Muscle with Multimodality Ultrasound Techniques: An Animal Study." *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 46, no. 2, Feb. 2020, pp. 377–92, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.10.004>.
- Zuo, Kevin J., et al. "Electrical Stimulation to Enhance Peripheral Nerve Regeneration: Update in Molecular Investigations and Clinical Translation." *Experimental Neurology*, vol. 332, 2020, p. 113397, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113397>.
- Вишневецький, В. О. "Причини, Діагностичні Помилки При Ушкодженнях Периферичних Нервів Кінцівок." *Запоріж. Мед. Журн*, 2014, pp. 50–55.
- Гайко, О. Г. "Оцінка Ступеня Тяжкості Ушкоджень Та Перспектив Відновлення Нервів При Первинному Електроміографічному Дослідженні Хворих з Травмою Периферичних Нервів Верхньої Кінцівки." *Літопис Травмотології Та Ортопедії*, no. 1–2, 2011, pp. 21–28.
- Мак-Комас, А. Дж. *Скелетные Мышцы*. Олимпийская литература, 2001.