

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ТРАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГАЙОВИЧ ІГОР ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК: 616.833.58-089.844-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**АУТОПЛАСТИКА ДЕФЕКТІВ НЕРВІВ З ЗАСТОСУВАННЯМ
ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ТА ПУНКТАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.01.21 - травматологія та ортопедія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають

посилання на відповідне джерело

_____ Гайович І.В.

Науковий керівник: Страфун Сергій Семенович, член-кореспондент НАМН
України, професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Гайович Ігор Володимирович. Аутопластика дефектів нервів з застосуванням жирової тканини та пунктату кісткового мозку (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.21 «Травматологія та ортопедія». – ДУ «Інститут ортопедії та травматології НАМН України», Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена проблемі проростання аксонів через ділянку аутопластики нерва. Результати експериментальних досліджень дозволили встановити особливості регенерації сідничого нерва через дефект шляхом використання методу аутопластики.

Експеримент проведений на 50 статевозрілих кролях, вагою 3,2-3,5 кг. Тварини були розділені на 5 груп: Група 1 - контрольна- без ушкодження сідничого нерва; група 2 група виконувалася аутопластика сідничого нерва; група 3- аутопластика нерва і трансплантація жирової тканини; група 4- пластика нерва поєднувалася з застосуванням суспензії кісткового мозку; група 5 пластика нерва з комбінованим застосуванням клітинних суспензій. Тварини виводилися з експерименту в 2 серії- в термін 1 та 3 місяці після операції (по 25 кролів)

Тваринам наносили дефект сідничого нерва довжиною 1 см, та здійснювали пластику виділеним сегментом нерва. В контрольній групі нерв залишався неушкодженим. В другій дослідній групі виконувалася лише аутопластика дефекту нерва. В третій дослідній групі в зону навколо нерва після пластики наносили оброблену жирову тканину отриману з зони великого сальника. В четвертій групі приготувану суспензію кісткового мозку отриману аспірацією з проксимального відділу стегнової кістки наносили навколо сегмента пластики сідничого нерва. В п'ятій групі зону пластики вкривали сумішшю жирової тканини та аспірату кісткового мозку.

Дослідження метаболічних показників фрагменту травматично ушкодженого нерва через 1 та 3 місяці після пластики та застосування

трансплантації жирової тканини і кісткового мозку в якості засобів стимулювання регенерації засвідчили часткову нормалізацію реакцій окисно-відновної рівноваги та компенсаторну активацію окремих ланок антиоксидантного захисту.

Трансплантація жирової тканини вплинула на активацію проростання (до 67,4%) нервових волокон крізь сегмент аутопластики травмованого нерва, при цьому відмічено ділянки з адипоцитами в епіневрії та збільшення щільності нейролемоцитів у ділянці шва.

Застосування кісткового мозку у гострому періоді активувало регенерацію осьових циліндрів і нейролемоцитів, що підтверджується проростанням поодиноких нервових волокон через дистальний шов через місяць після пластики, проте у віддалений період регенерація характеризувалась розвитком вторинної дегенерації, хоча загальна кількість волокон також була у межах 64,2%.

Гістоструктура нерва групи 2 - після аутопластики мала іншу архітекtonіку порівняно з неушкодженим нервом. Через 1 міс після травми зона аутопластики характеризувалася відновленням анатомічної будови нерва, чітко реєструвалися проксимальний і дистальний шви. На гістологічному рівні фасцикули проксимального і дистального сегментів, зона аутопластики суттєво розрізнялися. Епіневрій сідничного нерва у тварин дослідної групи представлений товстою смугою щільної сполучної тканини, особливо в ділянці епіневрального шва.

Ділянка дистального шва характеризувалась посттравматичною активацією нейролемоцитів, інкапсуляцією шва, реорганізацією сполучної тканини нерва. У терміни 1 міс ознак регенерації нервових волокон через дистальний шов не реєстрували, а у терміни 3 міс встановлено проростання осьових циліндрів у дистальний відрізок нерва у кількості $4773,4 \pm 229,6$ нервових волокон/мм² ($P < 0,05$), тобто 49,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольним показником інтактного нерва. При цьому відмічено ознаки вторинної дегенерації окремих нервових волокон.

У групі 3 з трансплантацією жирової тканини реєстрували кращу посттравматичну регенерацію нерва. Дистальний сегмент нерва характеризувався збільшенням товщини епіневрії, міграцією активованих фібробластів,

стазованими мікросудинами. Через 3 міс у дистальному відрізку нерва число регенованих нервових волокон становило $6477,3 \pm 329,5$ мм², що на 35,6 % більше від групи 2 ($P < 0,05$).

У групі 4 з застосуванням кісткового мозку встановлено регенерацію нервових волокон у дистальний сегмент нерва через 1 місяць на рівні $851,9 \pm 54,3$ мм² (8,8 % від контролю, $P < 0,05$). Через 3 міс число регенованих нервових волокон становило $6166,3 \pm 255,9$ мм², що на 29,1 % більше від групи 2 ($P < 0,05$).

У групі 5 комплексного застосування суміші жирової тканини і кісткового мозку, також встановлено проростання нервових волокон через дистальний шов. Рівень регенерації у термін 1 місяця становив $906,0 \pm 54,4$ од/мм² (9,4% від контрольного показника, $p < 0,05$), а через 3 місяці – $6680,1 \pm 337,1$ од/мм², тобто на 39,9% більше щодо показника у групі порівняння ($p < 0,05$).

Розвиток окиснювального стресу і наступне перекисне окиснення структурних компонентів клітин є одним із основних патогенетичних шляхів пошкодження тканин і органів при травматичному і ішемічному ураженні. Найбільш інформативними показниками рівня окисного стресу є утворення дієнових кон'югатів із окиснених ліпідів, а також малонового діальдегіду, який виникає в тканинах при деградації поліненасичених жирів на тлі ушкодження активними формами кисню, служить маркером перекисного окислення ліпідів і окиснювального стресу та визначається не лише в тканинах, але і в плазмі крові, тобто є показником системних розладів.

Одночасно з цим відбувається окислювальна модифікація білків. Вільні радикали ушкоджують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи первинну, вторинну і третинну структуру білків, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули, тобто втрати її функціонального призначення.

Характерним маркером пошкодження білків за умов окиснювального стресу є утворення карбонільних груп при окисленні амінокислот: лізину, аргініну і проліну. Карбоксильні групи білків під дією активних форм кисню перетворюються в карбонільні групи, які, в свою чергу, можуть взаємодіяти з

аміногрупами, що в остаточному підсумку призводять до утворення поперечних зшивок між білковими молекулами і порушення їх активності.

У проведених експериментальних дослідженнях було встановлено, що через 1 місяць після ушкодження сідничого нерва та його аутопластики відбувається розвиток перекисного окислення ліпідів та деградація білків у дистальному сегменті нерва, що є результатом травматичного, ішемічного та метаболічного ушкодження.

Синтез глутатіону *de novo* та його відновлення реалізується за АТФ-залежним шляхом, тобто порушення мітохондріальної функції корелює із зниженням відновленого глутатіону.

Рівень пулу вільних SH-вмісних молекул, основу якого складає глутатіон, в гострому періоді зростала лише у групах з трансплантації жирової тканини, але у 3-місячний термін не відрізнялась від групи 1. Рівень продуктів пероксидації також зменшувався у гострому періоді і надалі зростав.

Активація глутатіонзалежної антиоксидантної ферментної системи нейтралізує реакції перекисного окислення ліпідів і підтримує у відновленому стані SH-групи протеїнів, забезпечуючи цим їх функціональну активність.

Різде збільшення активності цих ферментів у віддаленому періоді після аутопластики у групах трансплантації жирової тканини можна пояснити компенсаторними реакціями, які спрямовані на відновлення антиоксидантної системи. При цьому найбільше збільшення показників було встановлено при комбінованому застосуванні жирової тканини та кісткового мозку.

Активність каталази через 1 місяць після травми залишалась підвищеною, але через 3 місяці зменшувалась, а у групах з застосуванням кісткового мозку навіть була нижче контрольних значень. На противагу цьому активність ДТ-діафрази спершу зростала, але у наступний період не відрізнялась від групи з застосуванням жирової тканини.

Окрім того результати гістологічних та біохімічних досліджень засвідчили важливі дані структурно-метаболічних змін у скелетних м'язах при травмі периферійного нерва. Встановлено, що навіть при успішній аутопластиці нерва

розвиваються гіпотрофічні зміни, які з часом прогресують. При цьому в групах де пластика нерва поєднувалася з застосуванням кісткового мозку та жирової тканини нейродистрофічні зміни м'язів були менш вираженими, а реінервація та регенерація протікала більш активно, що підтверджувалося як дані гістологічних так і біохімічних досліджень. На основі аналізу біохімічних показників можна стверджувати, що суміш клітин жирової тканини у більшій мірі, ніж суспензія клітин кісткового мозку вплинула на метаболізм м'язів. Вплив комбінації клітинних суспензій, очевидно, визначається дією клітин, отриманих з кісткового мозку, оскільки за біохімічними показниками суттєвої різниці між групами ізольованого нанесення клітин червоного кісткового мозку та суміші клітинних суспензій не встановлено.

Ключові слова: аутопластика нерва, трансплантат жирової тканини, трансплантат кісткового мозку, регенерація нерва, метаболізм денервованих м'язів, регенеративна медицина.

ANNOTATION

Gayovich Igor Volodimirovich. Autoplasty of nerve defects with use of adipose tissue and bone marrow aspirate (experimental study). – Manuscript.

Thesis for Academic Degree of the candidate of medical sciences in specialty 14.01.21 – Traumatology and orthopedics. – SI “Institute of Traumatology and Orthopedics under NAMS of Ukraine”, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the problem of germination of axons through the area of peripheral nerve autoplasty. Results of experimental studies allowed to establish the features of sciatic nerve regeneration through a defect using the method of autoplasty. It was found that regeneration in the distal segment of the nerve takes place 1 month after plastic, and 3 months after autoplasty regeneration is established only at the level of 49.7%.

The experiment was conducted on 50 rabbits with a weight of 3.2-3.5 kg. Animals were divided into 5 groups: Group 1 - control - without damage of sciatic nerve; Group 2 performed autopsy of the sciatic nerve; group 3 - autoplasty of the nerve and transplantation of adipose tissue; group 4 - plastic nerve combined with the application of bone marrow suspension; Group 5 nerve plastic with combined application of cell suspensions. Animals were excluded from the experiment in 2 series - in the 1 and 3 months after the operation (25 rabbits).

The defect of sciatic nerve length of 1 cm was performed, and then nerve plastic with segment of the nerve was done. In the control group, the nerve remained intact. In the second experimental group, only the autoplasty of the nerve defect was performed. In the third experimental group in the area around the nerve, after the plastic, applied the treated fat tissue obtained from the area of the large omentum. In the fourth group, a bone marrow suspension prepared by aspiration from the proximal femoral bone was applied around the segment of the sciatic nerve plastics. In the fifth group, the area of plastics was covered with a mixture of adipose tissue and bone marrow aspirate.

The study of metabolic parameters of a traumatically injured nerve fragment in 1 and 3 months after plastics and the use of transplantation of adipose tissue and bone marrow as stimulation means of regeneration showed a partial normalization of reactions redox balance and compensatory activation of certain parts of antioxidant protection.

Transplantation of adipose tissue affected the activation of germination (up to 67.4%) of nerve fibers through the segment of autoplasmic of the injured nerve, with marked sites with adipocytes in epineuria and increased neurolemmocytes quantitie in the area of autoplasmic.

The use of bone marrow in the acute period activated the regeneration of axial cylinders and neurolemmocytes , which is confirmed by the germination of single nerve fibers through a distal place of suturing, within a month after plastic. But in the 3 month period regeneration was characterized by the development of secondary degeneration, although the total number of fibers was also within the range of 64.2%.

Histostructure of the nerve group 2 - after autoplasty had a different architectonics compared to the intact nerve. Within 1 month after injury, the zone of autoplasty was characterized by restoration of the anatomical structure of the nerve, and proximal and distal seams were clearly seen. At the histological level of the nerve fibers of the proximal and distal segments, the zone of autoplastics differed significantly. Epineuria of the sciatic nerve in animals of the this group was represented by a thick band of dense connective tissue, especially in the region of the epineural suturing.

The segment of the distal seam was characterized by post-traumatic activation of neurolemmocytes, encapsulation of the seam, and the reorganization of the connective tissue of the nerve. In the course of 1 month, signs of regeneration of nerve fibers through a distal seam were not recorded, and in the 3 months the germination of the axial cylinders in the distal nerve segment was established in the amount of 4773.4 ± 229.6 nerve fibers / mm² ($P < 0.05$), that is, 49 , 7% ($p < 0.05$) compared with the control index of the intact nerve. In this case, signs of secondary degeneration of individual nerve fibers were noted.

In group 3 with transplantation of adipose tissue, better post-traumatic regeneration of the nerve was recorded. Distal segment of the nerve was characterized by an increase in the thickness of the epineurium, the migration of activated fibroblasts, stasis of microvessels. After 3 months in the distal segment of the nerve, the number of regenerated nerve fibers was $6477.3 \pm 329.5 \text{ mm}^2$, which is 35.6% more than group 2 ($P < 0.05$).

In group 4 with the use of bone marrow, regeneration of nerve fibers in the distal segment of the nerve was detected in 1 month at $851.9 \pm 54.3 \text{ mm}^2$ (8.8% of control, $P < 0.05$). After 3 months, the number of regenerated nerve fibers was $6166.3 \pm 255.9 \text{ mm}^2$, which is 29.1% more than in group 2 ($P < 0.05$).

In group 5, with a complex application of a mixture of adipose tissue and bone marrow, germination of nerve fibers through the distal seam was also established. The level of regeneration in the 1 month period was $906.0 \pm 54.4 \text{ units / mm}^2$ (9.4% of the control index, $p < 0.05$), and after 3 months - $6680.1 \pm 337.1 \text{ units / mm}^2$, that is, by 39.9% more compared to group 2 ($p < 0.05$).

The development of oxidative stress and subsequent peroxidation of the structural components of cells is one of the main pathogenetic paths of damage to tissues and organs in traumatic and ischemic lesions. The most informative indicators of the level of oxidative stress are the formation of diene conjugates from oxidative lipids, as well as malonicdialdehyde, which occurs in tissues in the degradation of polyunsaturated fats against the damage of active forms of oxygen, serves as a marker of lipid peroxidation and oxidative stress and is determined not only in tissues, but also in blood plasma, that is, an indicator of systemic disorders.

Simultaneously, there is an oxidative modification of proteins. Free radicals damage the proteins throughout the length of the polypeptide chain, breaking the primary, secondary and tertiary structure of proteins, which leads to the aggregation or fragmentation of the protein molecule, that is, the loss of its functional purpose.

A characteristic marker of protein damage in conditions of oxidative stress is the formation of carbonyl groups in the oxidation of amino acids: lysine, arginine and proline. Carboxyl groups of proteins by the action of active forms of oxygen are converted into carbonyl groups, which, in turn, can interact with amino groups, which ultimately lead to the formation of cross-linking between protein molecules and the violation of their activity.

In the conducted experimental studies, it was found that 1 month after injury of sciatic nerve and its autoplasty there is a development of lipid peroxidation and degradation of proteins in the distal segment of the nerve resulting from traumatic, ischemic and metabolic damage.

The synthesis of glutathione de novo and its reduction is realized by the ATP-dependent way, that is, the disturbance of the mitochondrial function correlates with the reduction of reduced glutathione.

The level of a pool of free SH-containing molecules based on glutathione in the acute period increased only in adipose tissue transplantation groups, but did not differ from group 1 for a 3-month period. The level of peroxidation products also decreased in acute period and further increased.

The activation of the glutathion-dependent antioxidant enzyme system neutralizes the reaction of lipid peroxidation and supports the restored state of the SH-group of proteins, thus ensuring their functional activity.

The sharp increase in the activity of these enzymes in the remote period after autoplasty in the group of adipose tissue transplantation can be explained by compensatory reactions, which are aimed at the restoration of the antioxidant system. At the same time, the greatest increase in the indicators was established with the combined application of adipose tissue and bone marrow.

The activity of catalase 1 month after the injury remained elevated, but after 3 months it decreased, and in groups with bone marrow usage even below the control values. In

contrast, the activity of DT-diaphoresis first increased, but in the next period did not differ from the group with the use of adipose tissue.

In addition, results of histological and biochemical studies have shown important data of structural and metabolic changes in skeletal muscles after peripheral nerve injury. It has been established that even with successful nerve autoplasty, hypotrophic changes that progress over time develops. Based on the analysis of biochemical parameters, it can be argued that the suspension of adipose tissue cells to a greater extent than the suspension of bone marrow cells affected the muscle metabolism. The effect of the combination of cell suspensions is obviously determined by the action of cells derived from bone marrow, since according to biochemical evidence there is no significant difference between isolated bone marrow and cell mixture suspensions.

Key words: nerve autoplasty, adipose tissue transplant, bone marrow transplant, nerve regeneration, metabolism of denervated muscles, regenerative medicine.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гайович І.В. Вплив суспензії жирової тканини на відновлення периферійного нерва після аутопластики дефекту / Гайович І.В., Страфун С.С., Гайович В.В., Борзих Н.О., Савосько С.І. // Вісник ортопедії, травматології та протезування. - 2015. - №4. - С. 46-50.
2. Гайович І.В. Вплив трансплантації концентрованої суспензії червоного кісткового мозку на структурно-функціональне відновлення сідничного нерва після аутопластики / Гайович І.В., Страфун С.С., Гайович В.В., Борзих Н.О., Савосько С.І. // Літопис травматології та ортопедії. - 2016. - №1-2. - С. 96-102.
3. Гайович І.В. Застосування жироплазмотромбоцитарної тканинної суміші у регенерації травматично ушкодженого периферійного нерва / Гайович І.В., Борзих Н.О. // Травма. - 2016 - №2 (17). - С. 73-77.
4. Гайович І.В. Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження) / Гайович І.В., Савосько С.І. // Травма. - 2018 - №2 (19). - С. 51-61.
5. Гайович І.В. Нейрометаболичні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва / Гайович І.В., Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. // Вісник морської медицини. - 2018. - №1 (78). - С. 74-84.
6. Гайович І.В. Досвід використання аутологічних клітинних технологій при відновленні периферичних нервів / Страфун С.С., Гайович В.В., Савосько С.І. В: Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Травматичні ушкодження центральної та периферичної нервової системи». Кам'янець-Подільський, Програма, Тези доповідей; 2016 вер 15-16; Кам'янець-Подільський, Україна. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2016. с. 71. Очна участь, виступ із доповіддю.
7. Гайович І.В. Пластика дефектів нервів з застосуванням аспірату кісткового мозку та жирової тканини В: Конференція молодих вчених ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України». Київ, програма, матеріали конференції. Літопис травматології та ортопедій; 2017 17 лютого; №1-2 с.184. Очна участь, виступ із доповіддю.

8. Gaiovych I., Strafun S., Gaiovych V. Using of bone marrow and fat to improve nerve regeneration after autoplasic. In: 6th Vienna Symposium on Surgery of Peripheral Nerves, Present state of Peripheral Nerve Surgery and New Ideas to Improve the Result;. 2017 March 17-19; General Hospital Lecture Halls, Vienna, Austria. Organiser: Millesi Center Vienna: P15 Очна участь, виступ із доповіддю.
9. Гайович І.В. Страфун С.С. Використання сучасних клітинних технологій в лікуванні ушкоджень периферичних нервів. Матеріали міжнародного симпозіуму по реконструкції нервів, неврології та реабілітації. «Реконструкція периферичних нервів після тяжких ушкоджень»; 2016 19-20 травня; Київ, Україна: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. Очна участь, виступ із доповіддю.
10. Гайович І.В. Страфун С.С. Клітинні технології в сучасній ортопедії та травматології. Матеріали міжнародної конференції «Регенеративні технології в сучасній медицині»; 2017 25-26 травня; Одеса, Україн: Міністерство охорони здоров'я України. Всеукраїнська асоціація пластичних реконструктивних і естетичних хірургів. 2017 Очна участь, виступ із доповіддю.
11. Гайович І.В. «Аутопластика дефектів нервів з застосуванням жирової тканини та пунктату кісткового мозку». (експериментальне дослідження). Матеріали засідання вченої ради ІТО НАМН України. 2018 26 червня; ДУ ІТО НАМН України. Очна участь, виступ із доповіддю.
12. Гайович І.В. ГАЙОВИЧ В.В; ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України", патентовласник. Спосіб хірургічного лікування пошкоджень периферичного нерва. Патент України на корисну модель №122507.10.01.2018

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	12
ЗМІСТ	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	18
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
РОЗДІЛ 1: МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	44
1.1 Методика проведення експерименту	44
1.2. Гістологічне дослідження	45
1.3. Біохімічне дослідження	46
РОЗДІЛ 2: ГІСТОМЕТАБОЛІЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТРАВМАТИЧНО УШКОДЖЕНОГО НЕРВА ЗА УМОВ АУТОПЛАСТИКИ	52
2.1. Регенерація сідничого нерва на тлі аутопластики великого дефекту травматичного ушкодження та впливу клітинних суспензій на процеси відновлення	52
2.2. Метаболічні зміни ушкодженого сідничого нерва після аутопластики і трансплантації	74
РОЗДІЛ 3: ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНОГО ПЕРІОДУ ТРИВАЛО ДЕНЕРВОВАНИХ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ТА ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ ЇХ МЕТАБОЛІЧНОЇ ПІДТРИМКИ	82
3.1. Результати досліджень впливу трансплантації жирової тканини і кісткового мозку на атрофічні зміни скелетних м'язів	82

3.2. Гістологічні зміни м'язів гомілки при травмуванні та пластиці сідничого нерва	88
РОЗДІЛ 4: РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІДНОВНИХ ПРОЦЕСІВ У ТРАВМАТИЧНО УШКОДЖЕНОМУ СІДНИЧОМУ НЕРВІ ТА М'ЯЗАХ ГОМІЛКИ У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ	103
4.1. Результати досліджень регенерації сідничого нерва після невротомії та пластики	103
4.2. Результати досліджень структурних змін м'язів гомілки після невротомії та пластики сідничого нерва	111
РОЗДІЛ 5: МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ ТРАВМАТИЧНО УШКОДЖЕНОГО НЕРВА ТА ДЕНЕРВОВАНИХ М'ЯЗІВ ПІСЛЯ ПЛАСТИКИ У ВІДДАЛЕНИЙ ПЕРІОД	120
5.1. Результати біохімічних досліджень сідничого нерва	120
5.2. Результати біохімічних досліджень скелетних м'язів гомілки	124
РОЗДІЛ 6 : АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	128
ВИСНОВКИ	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	138
ДОДАТКИ	151

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофічний фактору мозку
- FGF (fibroblast growth factor) – фактори росту фібробластів
- C/SPI (cellulose/ soy protein isolate) – целюлоза/соєвий протеїн
- DT-діафораза – NAD(P)H-хіноноксидоредуктаза
- EGF (epidermal growth factor) — епідермальний фактор росту
- eNCSCs (epidermal neural crest stem cells) – епідермальні стовбурові клітини нервового гребня
- GDNF (Glial cell derived neurotrophic factor) – гліальний нейротрофічний фактор
- GGF-2 (glial growth factor) – гліальний фактор росту-2
- GPx (Glutathione peroxidase) – глутатіон пероксидаза
- GR (Glutathione reductase) – глутатіон редуктаза
- hfPS (hair follicle pluripotent stem) – плюрипотентні стовбурові клітини волосяних фолікулів
- HGF (hepatocyte growth factor)– фактор росту гепатоцитів
- IGF (Insulin-like growth factor) – інсуліноподібний фактор росту
- NGF (nerve growth factor) — фактор росту нервів
- NT-3 (Neurotrophin-3) – нейротрофін-3
- OECs (olfactory ensheathing cells) – нюхові огортаючі гліоцити
- PEDOT (poly (3,4-ethylenedioxythiophene) – полі (3,4-етилендіокситіофен)
- PRP (platelet rich plasma) – збагачена тромбоцитами плазма
- SH-групи – сульфгідрильні групи
- TGF- β (Transforming growth factor beta) – трансформуючий фактору росту β
- VEGF (Vascular endothelial growth factor) – судинний ендотеліальний фактор росту
- АФК – активні форми кисню
- ДК – дієнові кон'югати
- ДТНБК – 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота
- ЖТ – жирова тканина

КМ – кістковий мозок

МДА - малоновий діальдегід

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

МТТ – [3-(4,5-диметилтіазо-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід]

НСПК – нейральні стовбурові та прогеніторні клітини

ОМБ – окислювальна модифікація білків

ОМП – окисна модифікація протеїнів

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СКЖТ – стовбурові клітини жирової тканини

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітураова кислота

ТЖТ – трансплантація жирової тканини

ТКМ – трансплантація кісткового мозку

ТНФА – тіонітрофенільний аніон

ЧКМ – червоного кісткового мозку

ВСТУП

Актуальність та обґрунтування теми. Пошкодження периферичних нервів кінцівок – важкий і грізний компонент травм, що має довгострокові та непередбачувані наслідки. Згідно даних сучасної літератури від 3 до 10% гострих травм ускладнюються ушкодженням периферичних нервів того чи іншого ступеню в залежності від механізму травми. Переважно це пацієнти чоловіки середній вік яких від 30 до 40 років. Наслідком цих ушкоджень є втрата функції кінцівки, а лікування приводить до незадовільних результатів та втрати працездатності в більш ніж 60% випадків. Відсоток цих незадовільних результатів прогресує з важкістю уражень нерва. Крім того ізольоване ураження нерву буває досить рідко - оскільки нервові стовбури оточені масивом функціональних тканин. Ушкодження нерву, як правило поєднується з травмами кісток скелету (50-79%), ушкодженням судин (23%), м'язів і сухожиль (20-22%). Таке ушкодження навколишніх тканин призводить до фіброзування тканин в зоні ушкодження, що погіршує процеси регенерації, та знижує функціональний результат відновлення. Такі травми характеризуються значними гемодинамічними, неврологічними біомеханічними, функціональними розладами, що призводять до тривалої непрацездатності, довгої реабілітації і частих ускладнень [118, 148]. В результаті таких пошкоджень від 27% до 50% постраждалих стають інвалідами або змушені змінити професію. За даними авторів інвалідність при ушкодженнях нервів кінцівок становить 62,9%, з них інвалідами II групи стають - 15,5%, III групи - 47,7% [86, 95, 117]. Актуальність даної проблеми особливо зросла з зростанням кількості вогнепальних та мінно-вибухових травм. Такі ушкодження часто приводять до утворення первинних дефектів нерву – вириваючи його фрагмент. Крім того ці травмівні агенти ушкоджують навколишні м'які тканини та переломи кісток, спричиняють первинне забруднення рани та гнійні процеси, які призводять до значного фіброзування зони ушкодження та погіршуючи трофічні процеси в зоні регенерації нерву.

У лікуванні таких пацієнтів значну роль відводять первинній хірургічній допомозі, яка включає діагностику ушкоджених структур, первинній хірургічній обробці, яка при необхідності повинна перейти в повноцінне первинне відновлення ушкоджених структур, особливо це стосується стабілізації кісток скелету та ушкоджень судинно-нервових пучків. Але, як показує досвід та аналіз літератури, у гострому періоді, найбільш поширеними причинами, що призводять до незадовільного результату, є діагностичні помилки у вигляді несвоєчасного, неповного і неправильного розпізнавання пошкоджень нервових стовбурів (47,4%) [152].

Майже у 86,7% хворих результати втручань на периферичних нервах під час первинної хірургічної обробки рани були незадовільними через технічні помилки, що в подальшому потребувало повторного оперативного втручання. Частота незадовільних результатів лікування травм нервів сягає 30-40% [148] і сучасні реалії вимагають від лікарів-травматологів володіння мікрохірургічною технікою при наданні допомоги таким пацієнтам, оскільки її використання дозволяє суттєво розширити можливості відновлень периферичних нервів.

Пошкодження нервів, як правило, своєчасно не діагностують через важкість стану пацієнтів, поліморфність скарг та больового синдрому. При наданні первинної допомоги лікарі концентрують увагу на відновлення гемодинаміки, стабілізації життєво важливих функцій організму, і діагноз травми нерва встановлюють в перші 2 тижні у третини пацієнтів, а у 5% - в терміни більше 6 місяців через відсутність відповідної настороженості лікарів і недостатнім знанням клінічних проявів ушкоджень нервів. Тактичні помилки пов'язані з неправильними діями лікаря при встановленому діагнозі пошкодження нерва спостерігають у 63% випадків [119]. Тому навіть при відкритих пошкодженнях у понад 25% хворих, нерви відновлюють через 6 місяців після травми. Відтермінування відновлення нерву веде до формування невроми проксимального кінця та дегенерації волокон в дистальному фрагменті нерву.

Проте незважаючи на значні досягнення оперативної хірургії нервів і судин кінцівок, що ґрунтуються на застосуванні різноманітних мікрохірургічних технік,

результати операцій на нервах у багатьох пацієнтів залишаються незадовільними [6, 46].

Функціональне відновлення нерва після його пластики в значній мірі залежить від важкості травми. Тому розмір ураження нерва визначає розмір нейротрансплантата, що в кінцевому рахунку впливає на результати відновлення. За даними Kim D.H., Kline D.G. (1996), відновлення м'язів до M3-M4 мають шанс 75% хворих, якщо довжина нейротрансплантата у них складала не більше 6 см, 35% хворих з довжиною трансплантата від 6 до 12 см і тільки 14 % пацієнтів з довжиною трансплантата від 13 до 20 см. Тобто задовільне відновлення функції м'язів при пластиці дефекту нерва понад 12 см чекати дуже сумнівно. На швидкість і повноту відновлення впливає і вік хворих. Так Durandean A. з колегами повідомили, що хороші результати при лікуванні таких хворих вони отримали у хворих віком від 19 до 26 років і розмірами дефектів до 8 см [17]. Отже чим більше дефект нерва, тим більші труднощі виникають при лікуванні [131].

На основі тканинної інженерії зроблені спроби розробки штучних трансплантантів, клінічна ефективність яких достовірно не підтверджена. Результати експериментальних робіт показали, що регенерація нервових волокон по штучно створеним трансплантатам здійснювалася не тільки не краще, але навіть гірше, ніж по тканинам власних ауто трансплантантів. Проаналізувавши результати пластики і розвитку ускладнень після операцій на нервах деякі автори вважають, що подальше вдосконалення нейропластики безперспективне і необхідна розробка нових способів виконання шва кінець в кінець [129].

Оптимальні способи мікрохірургічної нейрорафії і помірної distraкції дозволяють здійснити компенсацію сегментарного дефекту нервового стовбура при травматичній хворобі нерва і кістки за рахунок укорочення сегменту з метою подальшого відновлення його довжини на ранніх етапах регенерації методом монолокального distraкційного остеосинтезу [61].

При великих діастазах (2-2,5 см і більше) постає необхідність виконанні аутопластики нерва. Аллотрансплантація кріоконсерваними фрагментами

периферичних нервів стимулюють неоваскулогенез і відновлення ендоневрального судинного русла. В процесі регенерація активну участь приймають периневрій, що утворює мініфасцикули, що запобігає негативному впливу навколишніх тканинних чинників. Через 1 місяць після аутопластики регенерація відбувається шляхом обростання трансплантата, через 12 місяців відмічають остаточну резорбцію трансплантованого фрагмента нерва і утворення поздовжньо орієнтованих колагенових волокон. В дистальному відділі спостерігають задовільний результат відновлення.

Відомо, що при використанні різних аллотрансплантатів для відновлення периферичних нервів спостерігаються ряд негативних явищ, що обмежує їх застосування в практичній хірургії. Вони обумовлені тканинною несумісністю (відторгнення, резорбція трансплантату) або невідповідним підбором і підготовкою трансплантату, що завершується їх інкапсуляцією. Також відмічається виражена імунна реакція на 14-21 добу після трансплантації, що на більш пізньому етапі завершується поступовим формуванням рубцевої тканини в ділянці та навколо аллотрансплантату .

Одним з перспективних напрямів управління процесами регенерації периферичного нерва після травми є використання методів регуляції росту аксонів за штучно створеним напрямком. Направляючі шляхи спрямовують регенеруючі нервові волокна з центрального кінця нерва в периферичний, створюють канали для дифундуючих нейротрофічних факторів, що секретуються з пошкодженого кінця нерва; зменшують розвиток фіброзної сполучної тканини. У доповненні до цього дослідники оптимізують доставку в направляючі канали біологічно активних речовин та препаратів, що можуть стимулювати процес регенерації.

Одним з головних і найбільш досліджених факторів, що визначають ефективність регенерації і реіннервації денервованих м'язів є фактор росту нервів (NGF). Дослідження камбаловидних м'язів при експериментальній невротомії великогомілкового нерва показали, що маса м'язової тканини на 10% зростала при введенні NGF, сила скорочення - на 17%, тонус м'яза - на 15%.

Сучасні експериментальні дослідження показують покращення регенерації нерва під дією недиференційованих та стовбурових клітин диференційованих в нейрогліальному напрямку. Але клонування та диференціація клітин є довготривалим та вартісним процесом, тому ведуться пошуки доступних в клініці клітинних методів покращення результатів пластики нерву. Дослідження показали, що збагачений тромбоцитами гель здатний стимулювати регенерацію нерва через проксимальний та дистальний шва на 76,7% краще, порівняно з контрольною групою. Це пояснюється дією факторів росту які зменшують запалення в зоні пластики, через більш активний неоангіогенез покращують трофіку нерва та стимулюють міграцію стовбурових клітин в зону ушкодження. Це все сприяє більш оптимальному процесу репарації в зоні пластики, формуванню меншої кількості фіброброзної тканини та проростанню більшої кількості аксонів через дистальний шов.

Подальшим розвитком клітинних технологій є використання жирової тканини в поєднанні з збагаченою тромбоцитами плазмою та пунктату кісткового мозку як більш концентрованих порівняно зі збагаченою тромбоцитами джерела факторів росту та стовбурових клітин. Крім того жирова тканина може виконувати функцію прокладки в зоні пластики, покращуючи ковзні властивості нерва та попереджаючи надмірне здавлення нерву рубцем в зоні пластики особливо в зоні дистального шва.

Але подібні дослідження є спорадичними, проводилися лише з використанням якоїсь однієї технології та без порівняння їх поєднання. Тому необхідним є проведення порівняльних досліджень які б показали ефективність протікання репаративно-відновних процесів в зоні пластики нерву в умовах застосування в зоні пластики застосування жирової тканини та пунктату кісткового мозку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота виконана в межах наукової тематики «Розробити технологію лікування та реабілітації хворих з бойовою поліструктурною травмою кінцівок».

Мета дослідження: дослідити вплив жирової тканини та аспірату кісткового мозку на відновлення нерва та денерваційні процеси у м'язах, розробити оптимальну технологію, яка б дозволила покращити результати пластики периферичних нервів для впровадження в клінічну практику.

Завдання:

1. В експерименті дослідити вплив концентрованого аспірату кісткового мозку на зону пластики дефекту нерва.
2. В експерименті дослідити вплив жирової тканини на зону пластики дефекту нерва.
3. В експерименті дослідити вплив суміші жирової тканини та аспірату кісткового мозку на зону пластики дефекту нерва.
4. На основі результатів гістологічних досліджень в умовах експерименту дослідити кількісні та якісні показники репаративно-відновних процесів для подальшої їх екстраполяції для застосування в клінічній практиці.
5. На основі результатів гістологічних досліджень дослідити вплив жирової тканини та концентрованого аспірату кісткового мозку на процеси формування фіброзних тканин навколо зони пластики нерву.

Об'єкт дослідження: ушкоджені нерви та навколишні тканини в зоні пластики дефекту нерва.

Предмет дослідження: репаративно-відновні процеси при пластиці дефекту нерва та процеси формування рубців в зоні пластики.

Методи дослідження: біохімічний (метаболічні зміни окисно-відновного профілю та активності ферментативних систем сідничого нерва, метаболічні зміни та зміни активності ферментативних систем скелетних м'язів гомілки), гістологічний (гістологічні зміни у сідничому нерві та скелетних м'язах гомілки), морфометричний (щільність нервових волокон сідничого нерва, площа поперечного перерізу м'язових волокон, площа ядер м'язових волокон, кількість ядер на м'язове волокно), статистичний аналіз (методи математичної статистики).

Наукова новизна роботи:

1. Уточнено наукові дані про вплив різних клітинних технологій на процеси регенерації нерву через трансплатат великого розміру.
2. Вперше проведено порівняльну оцінку впливу жирової тканини, аспірату кісткового мозку та їх суміші на біохімічні процеси в нервовому волокні за умов аутопластики великих його дефектів.
3. Вперше в умовах експерименту досліджено та порівняно вплив жирової тканини, аспірату кісткового мозку та їх суміші на денерваційні процеси у м'язах на ранніх стадіях регенерації та у віддаленому періоді.
4. Вперше в експерименті доведено ефективність застосування жирової тканини для профілактики формування фіброзних тканин навколо трансплатату та відновлення ковзної системи нерва.
5. Вперше на основі експериментальних, гістологічних та біохімічних досліджень обґрунтовано застосування суміші жирової тканини та аспірату кісткового мозку як такої що комплексно оптимізує процесі регенерації ушкодженого нерва через нейротрансплантат та зменшує ступінь нейродистрофічних процесів у м'язах.

Практичне значення одержаних результатів. На основі отриманих даних розроблено та впроваджено в клінічну практику технологію покращення результатів відновних операцій при ушкодженнях нерва з застосуванням суміші аспірату кісткового мозку та жирової тканини.

Особистий внесок автора. Дисертація є особистою працею здобувача. Автором дисертаційної роботи особисто проведено аналіз сучасного стану питання лікування ушкоджень периферійних нервів, на різних рівнях в різні строки після травми, з різними розмірами дефектів та в залежності від тяжкості вихідного стану. В експерименті досліджено вплив різних клітинних технологій на процеси регенерації нерву через трансплатат великого розміру, проведено їх порівняльну оцінку, вивчено вплив на денерваційні процеси у м'язах на ранніх стадіях регенерації та у віддаленому періоді. Отримані дані підтверджені за допомогою гістологічних та біохімічних досліджень. З урахуванням отриманих результатів розроблено та впроваджено в клінічну практику технологію

покращення результатів відновних операцій при ушкодженнях нерва з застосуванням суміші аспірату кісткового мозку та жирової тканини.

Впровадження результатів дослідження. В практиці відділу «Мікрохірургії та реконструктивної хірургії верхньої кінцівки» ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» застосовано використання суміші аспірату кісткового мозку та жирової тканини при реконструктивних втручаннях на периферійних нервах.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були висвітлені на Вченій Раді ДУ ІТО НАМНУ (Київ, 2018); другій науково-практичній конференції з міжнародною участю (для молодих вчених) «Актуальні проблеми сучасної ортопедії та травматології» (Чернігів, 2015); Засіданні товариства ортопедів травматологів Києва та Київської області (Київ, 2016); XVII з'їзді ортопедів-травматологів України (Київ, 2016); Науково-практичній конференції «Міждисциплінарні проблеми ревматології» (Київ, 2016); Міжнародному симпозіумі «Реконструкція периферичних нервів після тяжких ушкоджень. Неврологія та реабілітація» (Київ, 2016); Міжнародній конференції «Регенеративні технології в сучасній медицині» (Одеса, 2017); 6th Vienna Symposium on Surgery of Peripheral Nerves (Відень, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових праць у фахових наукових виданнях з переліку ВАК України. Отримано патент №122507 на спосіб хірургічного лікування пошкоджень периферичного нерва.

Структура та обсяг роботи. Дисертацію викладено на 153 сторінках машинописного тексту і складається зі вступу, 6 розділів, висновків. Ілюстрована 37 рисунками і 13 таблицями. Список літератури містить 157 джерел інформації, з них 43 кирилических і 114 англомовних.

Дисертаційна робота виконана у клініці «Мікрохірургії та реконструктивно-відновної хірургії верхньої кінцівки» ДУ «Інституту травматології та ортопедії НАМН України».

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

На відміну від більшості тканин людського організму, у яких процеси регенерації ідуть як з проксимального так і з дистального від місця ушкодження боку – регенерація нервової тканини є значно більш складним та тривалим процесом [9, 21, 135, 140]. Окрім того що регенераторні процеси нервової тканини відрізняються від інших - так ще й регенерація самої нервової тканини центральної та периферичної ланки різниться між собою [5, 12, 33, 135, 157].

Історію вивчення регенераторних механізмів периферичної нервової системи можна розпочати з 1850 року, коли Август Валлер вперше описав процеси дегенерації дистальних від місця ураження нервових волокон – після пересічення язико-глоткового та під'язикового нервів у жаби [89, 135]. В подальшому дослідженням регенерації периферичної нервової системи займалися багато як вітчизняних так і зарубіжних вчених. Проте незважаючи на те що дослідження проблеми триває вже більше ніж півтора століття – відкриваються все нові та нові аспекти процесу відновлення нерва, а отже і ланки регенерації на які можна впливати ззовні [12, 33, 66, 135, 157].

Найбільш поширеними серед механізмів ушкоджень нервів є: відкрита травма, тракційне та компресійно-ішемічне його ураження [9, 66].

Згідно даних деяких авторів – найбільш поширеними є саме тракційні ушкодження нервів. Проте завдяки проходженню у межах фасціальних шарів, та своєму зигзагоподібному ходу у тканинах – нерв має певний “надлишок довжини”. Коли сили що діють при розтягненні нерва перевищують цей “надлишок ” – навантаження падає на периневрій, що оточує кожне нервово волокно та складається з еластану та колагену. Саме периневрій визначає спроможність нерва витримувати розтягнення на 10-20% початкової довжини [56, 57, 98]. У разі ж, коли навантаження значно перевищують можливі ресурси нерва – відбувається його ушкодження або у вигляді внутрішньостовбурового ураження, або в разі більш важких – авульсивних ушкоджень (відриву корінців нерву від спинного мозку). Більш вразливі до тракційних ушкоджень нерви – що

проходять через кілька анатомічних зон, та мають так звані “топографічні точки фіксації”, та нервові сплетення [9, 12, 56, 57, 98]/

Другим за частотою механізмом ушкодження периферичних нервів є відкрита травма. За дослідженнями деяких авторів подібні ураження становлять понад 30% серед усіх уражень нервів що потребують лікування. Це може бути як повне анатомічне ушкодження нервового стовбура, так і його часткове ураження, за якого незначна частина нервових волокон залишається. Саме ці пошкодження практично завжди потребують оперативного втручання, що направлене на відновлення анатомічної цілісності нерва. До цієї ж групи уражень нервів варто віднести і їх ятрогенні ушкодження під час хірургічних втручань [9].

Третій тип – компресійно-ішемічне ураження нервів, як правило це найбільш “легкий” тип ураження, що не потребує хірургічного, чи медикаментозного лікування та має оборотний характер. З патофізіологічної точки зору – виділяють дві причини виникнення клінічних проявів такого ураження – це тривала компресія нервового волокна та як наслідок його ішемія [9, 12, 22, 64]. Експериментальним шляхом було встановлено що порушення венозного кровотоку в епіневрії, та аксонотокую виникає вже при тиску 20-30 мм.рт.ст. Його збільшення призводить до зміни проникливості інтраневральних судин, та збільшує тиск інтерстиціальної рідини. Тиск від 130 мм.рт.ст викликає гострий блок проведення в нерві, та зміни морфології нервового волокна [15, 14, 30, 64, 70]. Проте експерименти з турнікетної ішемії периферичних нервів що проводились у 1930-х роках показали – що вплив на оборотність процесів які чинять блок провідності – має не стільки тиск з яким відбувається компресія нерва, скільки час ішемії нервового волокна. Так значимі гістологічні зміни у нерві визначаються лише при тривалості ішемії більше 8 годин [22, 32, 64, 70]. У разі тривалої ішемії – у нерві гістологічно визначаються дегенеративні зміни по його краям, а не в центрі де тиск найбільший. Дослідження ультраструктури нервового волокна при його стисненні демонструє, що аксоплазма та мієлін виштовхуються з зони максимального тиску до периферії [9, 15, 16, 14, 22, 64, 70].

Різні типи ушкоджень – відповідають різним гістологічним змінам структури нервового волокна, та потребують різного лікування [21, 66, 74]. В той час як одне ураження може лікуватися лише консервативними методами, інші ушкодження нервів потребують якомога більш раннього оперативного лікування. Така різноманітність ушкоджень нервового волокна потребувала створення відповідної класифікації котра давала б відповідь на питання вибору тактики лікування. Найбільш поширеною у світі, та такою що найбільш точно відображає гістологічну структуру ураження нерва є класифікація Седдона у модифікації Сандерленда [78]. Сер Герберт Седдон у 1943 році розробив та опублікував класифікацію ураження нервового волокна - у якій виділив три основних його типи: нейропраксію, аксонотмез та нейротмез. Пізніше, у 1978 році, її вдосконалив та опублікував у книзі “Nerves and nerve injuries” – сер Сідней Сандерленд, який розділив нейротмез нерва на три підгрупи в залежності від ушкодження нервових оболонок [9, 12, 21, 30, 32, 74, 78].

Перший тип ушкодження нервового волокна за Сандерлендом (або нейропраксія за Седдоном) – характеризується лише ураженням мієлінової оболонки нервового волокна. Це найлегший тип ушкодження нерва за якого зберігається анатомічна цілісність аксона. Ураження мієлінової оболонки нерва призводить до тимчасового блоку провідності. Такі ушкодження є минучими, та не потребують особливого лікування [9, 21, 30, 33, 74, 78].

Другий тип за Сандерлендом (або аксонотмез за Седдоном) – є більш важким ураженням за якого не лише вражається мієлінова оболонка, але й порушується анатомічна цілісність аксона. Аксонотмез в більшій мірі притаманний саме тракційним ушкодженням. Збереження нервових оболонок, не зважаючи на дегенерацію дистальної частини аксона та мієліну – дає задовільні результати щодо самостійного відновлення, хоча й потребує ретельного спостереження та адекватної медикаментозної терапії [9, 21, 33, 74, 78].

Третій тип по Сандерленду – характеризується не лише ушкодженням аксону та мієлінової оболонки, але й ураженням ендоневрію, що спричиняє порушення

мікроциркуляції нервового волокна та значно погіршує прогнози щодо відновлення [9, 21, 33, 78].

При четвертому типі ушкодження нервів за Сандерлендом – додатково вражається ще й периневрій, що ще більше порушує мікроциркуляцію за рахунок ушкодження внутрішньостовбурових *vasa nervorum* [9, 21, 33, 78].

Доволі часто такі ушкодження як третій та четвертий типи – супроводжуються рубцюванням каналу нервового волокна, що разом з локальною ішемією значно погіршує проростання аксонів та призводить до утворення внутрішньостовбурових невром [9, 21, 33, 78].

Найбільш важкий тип уражень – п'ятий тип за Сандерлендом (та нейротмезис за Седдоном) – характеризується ураженням всіх оболонок нерва (ендонеурій, периневрій та епинеурій), тобто повним анатомічним його переривом. Всі подібні ушкодження потребують якомога швидшого оперативного відновлення [9, 21, 33, 74, 78].

Ряд авторів виділяють ще комбінований тип ураження нервового стовбура, за якого можуть бути присутні усі п'ять типів ураження [9, 21, 32, 136, 137].

Після моменту ушкодження нервового волокна – як у дистальній його частині, так і у проксимальній починає відбуватись цілий ряд дегенеративно-регенераторних змін [31, 38, 66, 92, 107]. Важливо пам'ятати що аксон є невід'ємною частиною самого нейрона – і зміни що відбуваються в аксоні мають пряме відображення і в тілі нейрона. В більшості випадків регенерація нервового волокна залежить не лише від тяжкості самого ушкодження, але й від дегенеративних змін що виникають одразу за цим [5, 9, 12, 33, 45, 92].

З клінічної точки зору – найбільш важкими для відновлення, а отже і найбільш цікавими є ураження нервового волокна по типу нейротмезу, тобто повного його анатомічного перериву. Розглянемо саме такий тип ушкодження згідно з сучасними уявленнями про регенерацію нервового волокна [21].

Місце ураження нерва являє собою дезорганізовану масу з ушкоджених аксонів, шванівських клітин, капілярів, макрофагів та фібробластів. Ушкодження нерва та його оболонок спричиняє локальне порушення гемато-нейральний

бар'єру. Це у свою чергу викликає ряд автоімунних реакцій, що закінчуються частковою додатковою дегенерацією як дистального так і проксимального кінця нерва. Відбувається дегрануляція мастоцитів, та вивільнення медіаторів запалення, що збільшує проникність стінки капілярів, та міграцію макрофагів [9, 12, 31, 33, 66, 96, 107, 154].

Після травми нерву визначається набряк осьових циліндрів проксимальної його частини – та розвиток висхідної дегенерації [9, 31, 33, 38, 66, 110, 144]. У проксимальному фрагменті нерва визначається деструкція мієлінової оболонки, що вже через кілька годин після ушкодження супроводжується збільшенням кількості насічок Шмідта-Лантермана в мієліні, в подальшому мієлінові волокна фрагментуються в першу чергу в зонах перехватів Ранв'є [12, 31, 33, 144]. Ці процеси супроводжуються зменшенням діаметру аксону. Протяжність висхідної дегенерації визначається характером та важкістю травми. Вона може закінчуватись як на одному з перехватів Ранв'є, так і проходити весь шлях аж до нейрона (що більш характерно для значних проксимальних ушкоджень) – у таких випадках відбувається загибель нейрона [9, 12, 33, 38, 144, 154, 157].

Через, приблизно, 6 годин після ушкодження аксона – у тілі нейрона відбувається ряд процесів. Ядро ушкодженого нейрона мігрує на периферію, а тільця Ніссля, шорсткий ендоплазматичний ретикулум розпадається – цей процес отримав назву хроматолізу. Одночасно виникає проліферативна реакція периневральних гліальних клітин – що найбільш вірогідно пов'язана з процесом хроматолізу. Відростки гліальних клітин проростають до ураженого нейрона – та розривають його синаптичні зв'язки. Таким чином переводячи його з фази передачі сигналу – у фазу відновлення [9, 31, 33, 38, 45, 66, 144, 154]. Згідно даним літератури – після ушкодження аксона – загибель нейрона від апоптозу виникає у 20-50% [12, 33, 45, 144]. Ряд досліджень вказують на те, що в нормі, орган ефektor нейрону продукує фактор росту нервів, котрий у свою чергу ретроградним аксональним транспортом доставляється до тіла нейрона. Явище хроматолізу пов'язують з порушенням доставки NGF від органа-ефектора. Адже

було експериментально встановлено що штучне введення NGF у ушкоджений нейрон – стимулює зворотні до хроматолізу зміни [9, 16, 31, 33, 45, 55, 13, 144].

Виживанню нейронів після аксонотомії сприяє велика кількість трофічних факторів з декількох джерел, серед них нейротрофіни, нейропоеитичні цитокіни, інсуліноподібний фактор росту (IGF) фактори з гліальних клітин – роду GDNF та інші. Після аксонотомії збільшується кількість нейронів у яких відзначають експресію м-РНК мозкового нейротрофічного фактора (BDNF). Також синтез BDNF після травми нерва визначається і в клітинах-сателітах [27, 33, 38, 45, 72, 105, 107, 157].

Ці процеси одночасно супроводжуються проліферацією нейролемоцитів – шванівських клітин, пері- та ендоневральних фібробластів [9, 31, 66, 144, 154]. Вже через 48 годин у шванівських клітинах, під дією трансформуючого фактору росту β (TGF β що є мітогеном шванівських клітин та нейротрофічним фактором) відзначається набухання ядра, збільшення хроматину та розростання цитоплазми [63, 66, 73, 96]. Через 5-6 днів стають помітними мітози, утворюються синцитіальні цитоплазматичні тяжі з кількома ядрами – Бюнгерівські стрічки. Наприкінці першого тижня полібласти накопичуються на поверхні дегенеруючих нервових волокон, та в подальшому проникають у них – перетворюючись на макрофаги [9, 12, 31, 33, 66, 96, 144, 157].

В цей час у дистальній, периферичній, частині нерва відбувається ряд дегенеративних змін на всьому його протязі – що отримало назву валлерівської дегенерації [38, 66, 144, 154, 157]. Гістологічно вони характеризуються розпадом осьового циліндра та мієлінової оболонки нерва. При демієлінізації визначається збільшення кількості Ельцгольцевих тілець, вже на другий день проявляються різної глибини поперечні зазубрини. На 3-5 день оболонка розпадається на фрагменти які приймаючи еліпсоїдну, кулясту чи овоїдну форму в подальшому розпадаючись на дрібні зерна. В той же час риси осьового циліндру стають нерівними, імпрегнація сріблом – нерівномірною, проявляється їх повздовжня посмугованість та розволокнення окремих аксонів, їх варикозне набухання. На

другу добу визначається їх розпад на окремі фрагменти різної довжини, зміна їх калібру. На 5-6 добу осьові циліндри розпадаються на фрагменти утворюючи зернисту масу. В цей час в уражену частину нерва проникають шванівські клітини, котрі разом з макрофагами фагоцитують уламки осьового циліндру та мієлінової оболонки [9, 12, 33, 38, 66, 93, 144, 154].

У разі тяжких ушкоджень нервів – процеси їхньої регенерації починаються лише по закінченню періоду дегенерації. Регенерацію нервового волокна можливо розділити на кілька періодів та анатомічних зон. Так процеси регенерації відбуваються на наступних рівнях: тіло нейрона, сегмент між тілом нейрона до ділянки його ушкодження, ділянка ушкодження, сегмент між ділянкою ушкодження та органом ефektorом, орган ефektor

Порушення регенерації на одному з зазначених рівнів може призвести до патологічних змін, чи неефективної регенерації нерва загалом [9, 21, 144].

Макрофаги у зоні ураження нервового волокна – стимулюють синтез NGF, шляхом вивільнення інтерлейкіну- 1β . Було визначено, що шванівські клітини також здатні синтезувати нейротрофічні фактори у зоні ушкодження, серед яких є і NGF [21, 33, 55, 66, 93, 96, 107].

Початкові ознаки регенерації проявляються у тілі нейрона, та характеризуються змінами оборотними до процесу хроматолізу [2, 9, 45, 144, 157]. Так за відновлення транспорту NGF у тіло нейрона – ядро повертається з периферії до центра клітини, а розчинені у цитоплазмі нуклеопротейни реорганізуються у компактні тільця Ніссля. Після травми та хроматолізу – більшість метаболічних функцій нейрона змінюється. Так значно збільшується синтез РНК, в той час як синтез нейромедіаторів – пригнічується. Метаболізм клітини “перепрограмується” таким чином, що нейрон починає синтезувати значну кількість білків (GAP-43, тубулін, актин, а також нейропептиди та цитокіни) та ліпідів що необхідні для росту аксону у період регенерації [2, 9, 12, 33, 45, 82, 144]. Аксоплазматичний транспорт “перемикається” на транспорт матеріалів необхідних для відновлення з тіла клітини у ділянку регенерації аксона [9, 45, 82, 144, 157].

Відомо що регенераторний ріст центральних відростків нейронів різного фенотипу підтримують лише конкретні нейротрофічні фактори [69, 72]. Ріст аксонів, що експресують NF200 та належать до субпопуляції великих пропріоцептивних нейронів – стимулює лише нейротрофін-3 (NT-3). Ріст аксонів пептидгідричних ноцептивних нейронів підтримує лише NGF. Лише GDNF є універсальним стимулятором росту аксонів великих, малих пептидгідричних та малих непептидгідричних нейронів [33, 45, 66, 72].

У проксимальній частині ушкодженого нервового волокна відбуваються процеси регенерації аксонів нейронів що “вижили”. Діаметр аксонів збільшується, проте не досягає діаметру до травми. На кінці ушкодженого аксона виникає його булавоподібне здуття (“колба росту”) – з якого виростає кілька волокон що направляються до периферичного фрагмента та проникають у порожні шванівські оболонки [9, 12, 69, 82, 96, 144, 157]. На оболонках шванівських клітин що формують стрічки Бюнгера значно збільшується кількість рецепторів до фактору росту нервів. NGF що захватуються цими рецепторами – в подальшому презентуються “колбі росту” аксона – та ретроградним аксональним транспортом потрапляють до тіла нейрона де стимулюють подальший ріст аксона [23, 31, 55, 69, 82, 93, 96, 110, 144, 157]. Переважна кількість колб росту регенерує саме вздовж Бюнгерівських стрічок. Шванівські клітини відіграють незамінну роль сприяючи регенерації за рахунок збільшення ними синтезу поверхневих молекул клітинної адгезії, таких як N-CAM, Ng-CAM/L1, N-кадгерин та L2/ННК-1, шляхом зміни базальної мембрани, що містить багато клітин позаклітинного матриксу, таких як ламінін, фібронектин та тенасцин [31, 33, 66, 69, 73, 80, 82, 93, 96, 113]. У разі, коли аксони по мірі свого росту зустрічають перешкоду, вони можуть ділитись, та утворювати складні спіральні ходи що отримали назву спіралей Перрончіто. Новоутворені нервові волокна ще не мають мієлінової оболонки – котра наростає пізніше [9, 12, 33, 52, 66, 69, 80, 144, 157].

Головною запорукою правильної регенерації нерва, та відновлення функції цільового органа-ефектора при нейротмезисі – є відновлення анатомічної цілісності нервового волокна. На сьогодні це можливо декількома шляхами:

пряме відновлення цілісності нерва (шов нерва, або його склеювання спеціалізованим біологічним клеєм), або пластика нерва (аутологічними нервовими вставками за Мілезі, аллотрансплантатами, за допомогою аутологічних кондуїтів, чи за допомогою синтетичних скаффолдів) [8, 12, 29, 41, 51, 68, 100, 104, 111, 136].

Шов нерва є найбільш бажаним типом відновлення, проте доцільний він лише у тих випадках, коли діастаз між кінцями нерва не перевищує 2 см. При накладанні шва нерва – дуже важливо дотримуватись таких принципів:

- 1) Максимальна адаптація країв нерва
- 2) Запобігання значному тиску між кінцями нерва при накладанні шва
- 3) Запобігання гофрування нерва в місці його шва
- 4) Запобігання утворення інтраневральної порожнини (зшивання лише епіневрію)[21, 29, 111, 136]

Недотримання цих правил – спричиняє утворення сполучнотканинного рубця в ділянці шва нерва, а отже і значно погіршує його регенерацію та можливість аксонів прорости у дистальну частину. Ще одним негативним фактором, якого варто уникати в разі виконання шва нерва – це значний натяг його країв. Він, так само як і широка мобілізація країв нерва – викликає ішемію нервового волокна – та в разі пригнічує регенеративні процеси [12, 21, 29, 111, 136].

Використання спеціалізованих біологічних клеїв – дає змогу уникнути можливих ускладнень нервового шва, таких як порушення адаптації нерва, значний тиск в ділянці шва нерва, гофрування країв нерва, та утворення інтраневральних порожнин. Проте створює додаткову перешкоду для росту аксонів [21, 29, 51, 71, 111, 136].

У разі значних дефектів нервів – необхідно використовувати їх пластику. Найбільш часто, у сучасній хірургічній практиці, використовують пластику нервів за Мілезі. Сміслом цього методу – є заміщення дефектів нерва – нервовими аутоотрансплантатами вставками з інших нервів (для цього найбільш часто використовують шкірні чутливі нерви – наприклад: шкірний литковий нерв). Перевагою такого методу є використання аутологічного матеріалу, що має

однакову гістологічну будову з ураженим нервом. Недоліками – є втрата чутливості ділянки забору нерва, та зони його автономної іннервації. Ще одним недоліком цього методу є неспівпадіння діаметрів нерва-донора та нерва-реципієнта, що змушує використовувати декілька нервових вставок. І хоча при використанні кількох нервових-аутоотрансплантатів вставок вдається перекрити більшу частину площі поперечного перерізу нерва-реципієнта – залишаються місця, що не вкриті такими вставками – а отже ведуть до формування невроми [12, 21, 29, 37, 111, 136].

Використання нервових аллотрансплантатів дає можливість уникнути проблеми втрати чутливості в ділянці забору та автономної іннервації нерва-донора. Проте виникає проблема імунологічної сумісності подібних трансплантатів. В літературі зустрічається ряд робіт щодо використання децеллюляризованих нервових аллотрансплантатів – проте їх вагомим недоліком є відсутність клітинного матриксу з нейроремоцитів [21, 36, 37, 87, 136].

В літературі зустрічаються дані щодо використання децеллюляризованих нервових аллотрансплантатів, або рецеллюляризованих шваноподібними мезенхімальними клітинами, або виповнених нейротрофічними факторами. Проте використання подібних трансплантатів ще не пройшло клінічних випробувань, та є доволі дорогим методом [21, 28, 36, 37, 71, 73, 74, 87, 136].

Ряд робіт присвячені використанню аутологічних кондуїтів – заміщення дефектів нервів судинними аутоотрансплантатами. Найбільш поширеним методом є використання кондуїту з судинного аутоотрансплантату виповненого денатурованою м'язевою тканиною. Такий метод пластики може виконуватись лише для заміщення незначних дефектів. Недоліком такого методу є повна гістологічна невідповідність кондуїту – структурі нерва [19, 21, 59, 136].

Зустрічається ряд робіт, за яких кондуїт з судинного аутоотрансплантата виповнювався нейротрофічними факторами, або гіалуроновою кислотою [20, 71]. Проте це лише експериментальні дослідження [19].

Протягом останніх років досить активно розвивається напрямок створення синтетичних скаффолдів виповнених стромальними клітинами, або

нейротрофічними факторами для пластики нервів [8, 21, 26, 29, 44, 47, 48, 51, 60, 68, 73, 85, 97, 104, 113, 136]. Обов'язковими умовами є їх біосумісність, нетоксичність, біодеградуючі властивості, та створення сприятливих умов для стромальних клітин що у них трансплантуються. Матеріалом для таких скаффолдів слугує цілий ряд речовин: полі (3,4-етилендіоксидофен) (PEDOT), целюлоза/соєвий протеїн (C/SPI), скаффолди на шовковій основі, скаффолди на основі колагенового пептиду та гідрогелю, поліпіррол-полі(молочна кислота), епіневрій-мімікуючий цитозан, скаффолди з колагену, ламініну та фібронектину, скаффолди з кератину, нектиноподібних молекул, похідні полі(молочної кислоти) та інші [8, 10, 24, 26, 27, 41, 44, 47, 48, 54, 60, 62, 68, 71, 73, 76, 85, 91, 97, 100, 101, 102, 104, 106, 112, 113, 151]. Проте значним недоліком є висока вартість запропонованих методів, та необхідність у створенні спеціалізованих лабораторій [26, 29, 47, 48, 68, 85, 104, 113].

Отже на сьогоднішній день, найбільш адекватними та доступними методами відновлення анатомічної цілісності нерва – є шов нерва, та аутопластика нерва за Мілезі. А отже проблема проростання ділянок шва, а також загальна для уражень периферичних нервів проблема значної тривалості відновлення денервованого органа залишаються актуальними [21, 42, 111, 136].

Відомо, що у разі інтраопераційного гострого ушкодження нерва та його негайного шва – в кращому випадку можна очікувати проростання у дистальну частину лише 70% аксонів [12, 21, 42]. Нервові аутоотрансплантати-вставки що використовуються при пластиці нерва – “живляться” лише за рахунок явища дифузії, подальшої реваскуляризації та перебудови. Така особливість ставить під питання “виживаємість” великих аутоотрансплантатів в умовах постійної їх ішемії [29, 71, 75]. В літературі описані методики використання васкуляризованих нервових аутоотрансплантатів – проте можливості їх використання є дуже обмеженими [12]. Отже актуальною залишається проблема пошуку методу покращення, та прискорення регенерації нерва [29, 42, 111].

У науковій літературі зустрічається опис доволі великого арсеналу методів стимуляції регенерації нерва [21, 66, 99, 115, 138]. Одними з таких методів є

фізіотерапевтичний – на багатьох експериментах доведено що магнітне поле, та електростимуляція різної частоти та сили сигналу має певний позитивний вплив на регенерацію периферичного нервового волокна [66, 76, 91, 99, 115, 133, 153]. Зустрічаються згадки про використання низькочастотного пульсового ультразвуку для стимуляції мієлінізації нервових волокон [108, 115, 133].

В літературі описані методи міотизації ділянки нервового шва – тобто огортання шва м'язевим клаптом на судинній ніжці – що завдяки покращенню васкуляризації ділянки шва позитивно впливає на процеси регенерації нерва. Також описані подібні методики де в якості пластичного матеріалу використовували клапти з великого сальника, чи підшкірної жирової клітковини [139, 154].

Висвітлений цілий напрямок щодо застосування клітинних технологій, та технологій регенеративної медицини з метою стимуляції та покращенню регенерації нервових волокон [42, 66, 75, 101, 116, 130, 134, 138, 142, 143]. Більшість авторів серед потенційних стимуляторів регенерації периферичних нервів, як найбільш важливі виділяють: судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), ендотеліальний фактор росту (bFGF або FGF2), та NGF. VEGF – індукує як проліферацію шванівських клітин, так і стимулює неоангіогенез, що відіграє важливу роль в процесі регенерації нерва [21, 42, 66, 75, 101, 116, 120, 138, 142].

Описані методики покращення регенерації нерва шляхом імплантації в ділянки шва нерва, та у нервові ауто трансплантати-вставки – плазміди що містить VEGF та FGF2. Проте подібна методика є дороговартісною та потребує спеціалізованого обладнання [101, 137, 141, 147, 156].

Описані методики з трансплантації у нерв ембріональних закладок ЦНС та шванівських клітин. Подібні експерименти на щурах були проведені у 80-90-ті роки ХХ століття, та була доведена принципова можливість трансплантації ембріональних клітин ЦНС у нерв, і прослідковані їх розвиток та диференціювання протягом декількох місяців. Проте висока специфічність данного методу – не дає можливість його використання в клінічній практиці [42, 49, 66, 90, 132, 134, 142, 145, 149].

Цікавість серед науковців викликає можливість використання ембріональних стовбурових клітин. Вони виділяються на стадії бластоцисти, та мають властивість до диференціювання як в умовах *in vitro*, так і *in vivo*. Проте застосування цієї методики у практиці пов'язане, не тільки з проблемами етики використання ембріональних клітин людини, але й великою вірогідністю розвитку злоякісних новоутворень у тілі реципієнта, що було доведено в експериментах [21, 42, 49, 90, 132, 134, 142, 149].

Відкриття у 90-х роках минулого століття мультипотентних стовбурових клітин в ембріональному мозку ссавців – поклало початок досліджень щодо використання нейральних стовбурових та прогеніторних клітин (НСПК) [49, 66, 90, 132, 134, 142, 145, 149]. Також було доведено їх існування і у мозку дорослих ссавців у, так званих, нейрогенних зонах: субвентрикулярній зоні шлуночкової системи, та в зубчастій звивині гіпокампа. Проведені на щурах експерименти підтвердили можливість НСПК трансформуватись у шваноподібні клітини у разі їх трансплантації в кондуїт, чи у нейрони що експресують NeuN, β -III-тубулін і глутаматдекарбоксилазу, та GFAP-іммунопозитивні астроцити і p75-іммунопозитивні шванівські клітини - при трансплантації у нерв. Ряд досліджень показав більш позитивні результати, щодо регенерації ушкодженого нерва, у разі трансплантації генетично модифікованих НСПК з гіперекспресією BDNF, GDNF та NT-3 факторів [90, 105, 132, 142]. Проте деякі дослідники вказують що трансфекція генетичними конструкціями СК може супроводжуватись порушенням їх власного геному та призводити до розвитку пухлин. Відмічають високу туморогенність НСПК нейрогенних зон дорослого мозку. У зв'язку з цим використання НСПК у клінічній практиці не застосовується [42, 49, 66, 132, 142].

Доволі перспективним є використання клітин нюхового епітелію та нюхової цибулини, найбільш перспективними серед яких є нюхові огортаючі гліоцити, (OECs) [34, 66, 90, 132, 142, 149]. В експериментальних дослідженнях було встановлено що використання OECs в 1,3-2,5 рази покращує проростання аксонів у дистальній кінець нерва. Проте, існує думка що OECs самі не приймають участі у мієлінізації нерва, а лише стимулюють шляхом екскреції трофічних факторів –

ендогенні шванівські клітини. Це було підтверджено експериментально, шляхом трансплантації ОЕСs, шванівських клітин та їх суміші у ушкоджений сідничий нерв щура, і отримано найкращі результати у третьому випадку. Є випадки використання ОЕСs у клінічній практиці – проте їх широке застосування доволі обмежене за рахунок специфічності їх отримання [21, 34, 42, 66, 90, 134, 142].

У 2004 році у волосяних фолікулах щурів були виявлені клітини з ознаками стовбурових. На початку вони були названі епідермальними стовбуровими клітинами нервового гребня (eNCSCs), проте після більш детального їх вивчення вони отримали назву - плюрипотентні стовбурові клітини волосяних фолікулів (hfPS) [3, 21, 42, 66, 90, 142, 149]. Ці клітини утворюються з нервового гребня, ембріональної закладки, та у спеціально створених умовах вони можуть диференціюватись у клітинні типи різних зародкових листків. Додавання в середовище нейрорегуліна 1 призводить до диференціювання hfPS у шваноподібні клітини, а також нейрони, що експресують β -III-тубулін. Також за умов культивування стовбурові клітини волосяних фолікулів здатні утворювати структури що нагадують нейросфери. Мультипотентність цих стовбурових клітин була доведена в експериментах на курячих ембріонах [42, 90]. Так після трансплантації експресуючих GFP стовбурових клітин в ділянку вентральної частини нервової трубки курячого ембріона – вони диференціювались у нейрони ЦНС, а у разі трансплантації у ділянку дорзальної частини – клітини мігрували як і попередники нервового гребня та диференціювались у різні клітинні типи. Показано що в умовах трансплантації hfPS в ушкоджений нерв – вони диференціювались у шванівські клітини [3, 42, 90, 142]. Нестин-іммунопозитивні та кератин 15-іммунонегативні стовбурові клітини волосяних фолікулів шкіри голови людини вводили в ушкоджений сідничий нерв щурів. Встановлено що після трансплантації вони диференціюються у шванівські клітини (експресуючи основний білок мієліну та білок S100) та сприяють регенерації нервів [52, 66, 90]. Також вдалось визначити що трансплантація стовбурових клітин волосяних фолікулів сприяє життєздатності нейронів відповідного відділу спинного мозку. [3, 21, 90, 142]. Існує припущення що трансплантовані клітини виробляють

нейротрофіни та інгібітори хондроестинсульфату (котрий накопичується у нервових стовбурах при хронічному їх ушкодженні, та перешкоджає росту аксонів) [21, 42, 66, 143].

У 2012 році були виділені та охарактеризовані стовбурові клітини шкіри (епідерміса та дерми) вуха мініатюрних свиней. Встановлено що вони експресують деякі маркери характерні для мезенхімальних стовбурових клітин: CD29, CD44, CD90 та віментин. Після передиференціювання цих клітин в нейрональному напрямку проводили їх аллотрансплантацію в кондуїт що з'єднував кінці стегового нерва, та було доведено покращення регенерації аксонів [21, 66, 90, 142].

У 2009 році Кіґіма та співавторами іммуногістохімічним методом було встановлено що фракція моноклеарів периферичної крові людини містить незначну кількість CD133⁺-клітин. Клітини з таким фенотипом зустрічаються серед клітин попередників нейронів та ендотеліоцитів. Введення цих клітин в ушкоджений сідничий нерв щура – призвело до значного покращення його регенерації. Гістологічний аналіз показав що через 8 тижнів після операції - площа зайнята аксонами в чотири рази перевищувала результати контрольної групи [4, 42, 66, 75, 142]. Встановлено що трансплантовані клітини перетворюються у шванівські, та не диференціюються у ендотеліоцити. Трансплантовані в нерв екзогенні моноклеари можуть, трансформуючись у макрофаги, приймати участь у процесах валлерівської дегенерації, та у фагоцитуванні продуктів розпаду мієліну, тим самим сприяючи більш швидкій регенерації нерва. Крім того ці клітини можуть виділяти речовини що стимулюють ендогенні макрофаги нерва реципієнта [21, 66, 142].

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) – це клітини мезодермального походження що формують сполучну тканину у всьому організмі, та дають початок фібробластам, остеобластам, хондроцитам, адипоцитам та ендотеліоцитам [7, 19, 21, 40, 42, 66, 90, 116, 132, 134, 142, 149]. Джерелами мезенхімальних стовбурових клітин можуть бути: строма кісткового мозку, жирова тканина, пульпа зуба, пуповинна кров, амніотична рідина, мигдалини, та

інші [19, 43, 66, 90, 101, 132, 143]. Вибір таких джерел мезенхімальних стовбурових клітин як кістковий мозок, чи підшкірна жирова клітковина – пов'язаний з доступністю їх отримання та можливістю аутологічної трансплантації [7, 40, 42, 50, 66, 132, 143]. Окрім цього вони мають імуномодулюючі властивості, виробляють протизапальні цитокіни та антиапоптичні молекули. В дослідях *in vitro* доведено що МСК виділені з кісткового мозку, жирової тканини чи пуповини, відрізняються по здатності модулювати продукцію імуноглобулінів в клітинах В-лімфоїдного ряду. Встановлено також, що МСК з різних джерел відрізняються різною пластичністю, нейрогенним потенціалом, та паракринною активністю [21, 42, 50, 66, 90, 134, 142, 143, 149].

МСК виділені зі строми кісткового мозку людини та ссавців, в певних умовах здатні до диференціювання у різні типи клітин, в тому числі і астроцити та нейрони. Також показано що мезенхімальні стовбурові клітини здатні до синтезу та секреції ростових та трофічних факторів: епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту гепатоцитів (HGF), FGF, TGF β , та білки екстрацелюлярного матриксу (колаген, фібронектин, ламінін) [7, 19, 40, 42, 50, 66, 84, 90, 94, 103, 132, 143, 149]. Позитивний вплив мезенхімальних стовбурових клітин на регенерацію периферичних нервів було доведено у багатьох експериментах на гризунах, кроликах, собаках та приматах. Показано що направлене диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин у шванівські клітини можливе при їх спільному культивуванні з нейронами спинно-мозкових гангліїв, або при додаванні у культуральне середовище гліального ростового фактора-2 (GGF-2). За таких умов змінюються морфологічна та фенотипова характеристики МСК. На початку культивування МСК мають морфологію фібробластів, та експресують: CD44, CD54, CD90. Потім клітини приймають біполярну форму, стають веретеноподібними схожими на культивовані шванівські клітини, та починають експресувати маркери шванівських клітин, секретувати BDNF та NGF, і при кокультивуванні з нейронами стимулюють ріст нейритів [11, 19, 42, 50, 66, 84, 90, 94, 100, 103, 132, 143, 149]. Встановлено що мезенхімальні стовбурові клітини

котрі були отримані як з кісткового мозку та і з амніотичної рідини сприяють відновленню пошкоджених нервових стовбурів експериментальних тварин [19, 21, 42, 50, 66, 84, 94, 103, 142, 143].

Щодо механізмів дії мезенхімальних стовбурових клітин на регенерацію периферичних нервів у літературі немає єдиної думки. Одним з механізмів вважається секреція трофічних факторів що сприяють відновленню нервових волокон. Трансплантовані у нерв МСК продукують $NGF\beta$, BDNF, NGF та NT-3. Завдяки здатності синтезувати трофічні фактори вони стимулюють проліферацію шванівських клітин реципієнта [11, 19, 27, 50, 66, 84, 90, 94, 100, 103, 105, 132, 130, 134, 143]. Другий механізм пов'язаний з можливістю диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин у шванівські клітини під дією трофічних факторів, що виділяються в проксимальному кінці ушкодженого нерва [11, 42, 50, 66, 90, 94, 100, 103, 105, 143].

Також до мезенхімальних стовбурових клітин відносять стовбурові клітини жирової тканини (СКЖТ) [39, 42, 50, 66, 77, 90, 132, 142, 146, 149, 150]. Такий тип стовбурових клітин виділяють шляхом дисоціації жирової тканини, отриманої в наслідок ліпосакції чи хірургічного видалення жирових відкладень, за допомогою колагенази та еластази. В спеціально підібраних умовах стовбурові клітини жирової тканини здатні до трансформації на нейрони, астроцити, остеобласти, клітини міогенного типу та інші [44, 50, 66, 90, 132, 142, 146]. Використовуючи суміші трофічних факторів, проводять направлене диференціювання СКЖТ у шванівські клітини. Показано що стовбурові клітини жирової тканини можуть виробляти ангіогенні фактори та фактори росту, синтез яких виростає при культивуванні в умовах гіпоксії. Одними дослідниками показано що використання стовбурових клітин жирової тканини для стимуляції росту нервових волокон краще, ніж використання шванівських клітин [44], інші, навпаки, вважають що краще використовувати шванівські клітини [39, 42, 50, 66, 77, 81, 90, 142, 143, 146, 149, 150]. Є.С. Петрова зі співавторами вивчали регенерацію передавленого маломілкового нерва у щурів, під впливом СКЖТ. Предиференціювання СКЖТ виконували в напрямку нервових клітин як джерела BDNF. Регенерацію нерва

оцінювали електрофізіологічним та морфологічним методами. Був зроблений висновок, що терапія СКЖТ стимулює відновлення нерва завдяки виділенню BDNF, котрий безпосередньо сприяє регенерації аксонів, створює сприятливе середовище для формування “колб росту”, перешкоджає апоптозу та індукує проліферацію шванівських клітин реципієнта [81, 132, 142, 143, 146]. Також відмічено позитивний вплив СКЖТ на ангиогенез у нерві [39, 44, 77, 81, 90, 105, 132, 142, 146, 150]. Окрім того деякі автори вказують, що застосування стовбурових клітин жирової тканини значно зменшує фіброзування травмованих ділянок, сприяючи утворення більш еластичних рубців [35, 132].

Гейл та співавтори провели дослідження по застосуванню стовбурових клітин жирової тканини у 328 жінок, що в минулому проходили лікування сприводу злоякісних новоутворень молочних залоз. Тривалість дослідження складала 88 місяців від оперативного втручання, та 32 місяців після застосування СКЖТ. Дослідження не виявило жодних ознак збільшення онкологічного ризику асоційованого з використанням стовбурових клітин жирової тканини [25].

Таким чином більшість досліджень виконаних з використанням МСК, показало, що ці клітини дійсно можуть сприяти регенерації ушкоджених нервових волокон [42, 50, 66, 132, 142, 143, 149, 150].

Ряд досліджень що зустрічаються у літературних джерелах вказує, що після трансплантації стовбурові клітини жирової тканини потрапляють у “несприятливе” середовище. Такі чинники як гіпоксія, окислювання та запалення зазвичай призводять до загибелі більшої кількості трансплантованих стромальних клітин [54, 75, 77, 79, 155]. Тому з метою подовження періоду виживання СКЖТ їх використовують разом зі збагаченою тромбоцитами плазмою (PRP). Проведені експериментальні дослідження свідчать що використання комбінації СКЖТ та PRP є багатообіцяючим підходом у різних сферах медицини [4, 11, 21, 42, 66, 75, 77, 79, 155].

РОЗДІЛ 1

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

1.1 Методика проведення експерименту

Експеримент проведений на 50 статевозрілих кролях, вагою 3,2-3,5 кг. Тварини були розділені на 5 груп: Група 1 - контрольна- без ушкодження сідничого нерва; група 2- виконувалася аутопластика сідничого нерва; група 3- аутопластика нерва і трансплантація жирової тканини (ТЖТ); група 4- пластика нерва поєднувалася з застосуванням суспензії кісткового мозку (ТКМ); група 5 пластика нерва з комбінованим застосуванням клітинних суспензій (комплекс). Тварини виводилися з експерименту в 2 серії- в термін 1 та 3 місяці після операції (по 25 кролів)

Премедикацію та знеболення дослідних тварин здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (і.р., 60 мг/кг). Доступ до нерва здійснювався через шкіру по зовнішній поверхні стегна, після чого тупо розшаровували м'язи на протязі 4 см виділяючи сідничий нерв (рис 1.1 а). Потім за допомогою мікрохірургічних ножиць здійснювалося висічення сегменту сідничого нерва довжиною 1 см. На наступному етапі здійснювали пластику виділеним сегментом нерва з накладанням епіпериневрального шва ниткою Prolene (Eticon) 8-0 (рис 1.1 б). В групі 2 – виконувалося ушивання рани. В групі 3 через доступ в передній черевній стінці з ділянки великого сальника здійснювали забір (шляхом висічення) 1 мл жирової тканини, яку подрібнювали та гомогенізували механічним способом – багаторазовим пропусканням через канюлю діаметром 1 мм. (рис 1.1 в). Після подрібнення ділянку пластики нерва вкривали отриманою суспензією та ушивали рану. В групі 4 кістковим троакаром діаметром 10G та шприцом 5мл з проксимального відділу стегна виконувалася аспірація кісткового мозку в об'ємі 2 мл з додаванням антикоагулянту цитрату декстрази АЦД-А (Бакстер С.А., США/Бельгія) (рис 1.1 г). Отриманий аспірат центрифугували протягом 8 хвилин в центрифугі з силою 760G. З пробірки

виконувалася аспірація 1 мл верхнього шару плазми та лейкоцитарного шару. Отриманим аспіратом вкривали зону нерва з додаванням 0,1мл тромбіну (*Thrombin, Bovine Sigma-Aldrich*) для отримання гелю, яким вкривали ділянку пластики, після чого виконувалося ушивання рани. В групі 5 за згаданою вище методикою отримували суспензію жирової тканини та аспірат кісткового мозку – змішували їх в співвідношенні 1 мл жирової тканини та 0,5 мл аспірату кісткового мозку, та отриманою сумішшю вкривали ділянку пластики з додаванням 0,1 мл тромбіну (Рис 1.1 д).

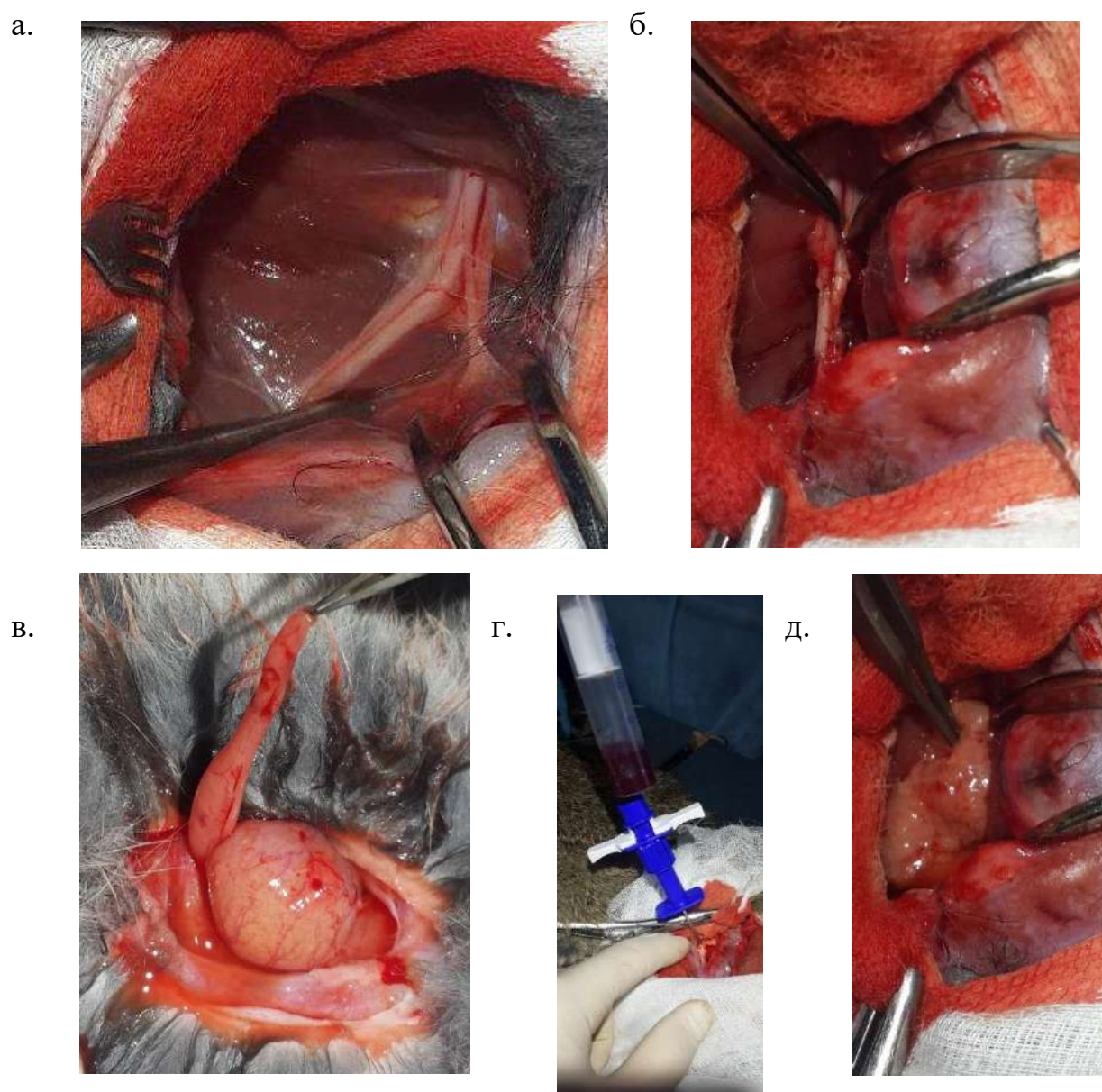


Рис. 1.1 Хід оперативного втручання: Виділення сідничого нерва та його пластика (а,б); забір жирової тканини з ділянки великого сальника (в); аспірація

кісткового мозку з проксимального відділу стегнової кістки (г); вкриття ділянки пластики нерва сумішшю жирової тканини та аспірату кісткового мозку(д).

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”, “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

1.2. Гістологічне дослідження

Через 1 місяць після проведеної операції тварин повторного наркотизували та здійснювали видалення і підготовку окремих сегментів травмованого сідничого нерва на м'язів гомілки для гістологічного дослідження. Фрагменти нерва поміщали в 10% нейтральний формалін, після чого із фіксованих ділянок на кріотомі виготовляли гістологічні зрізи товщиною 15-20 мкм. Із гістологічних методик фарбування були використані імпрегнація азотнокислим сріблом. Фрагменти м'язу після стандартної проводки в етанолі висхідних концентрацій (від 70% до 100%) заливали у парафін. Парафінові зрізи профарбовували гематоксилін-еозином. Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) та мікроскопу Olympus BX 51 (Японія). Порівняння отриманих результатів здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Рівень статистичної значущості був встановлений на рівні $P < 0,05$.

1.3. Біохімічне дослідження

Визначення рівня білка за методом Lowry. Метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [53]. Наважку тканини (100 мг) (попередньо висушеної на фільтрувальному папері), гомогенізували за допомогою

електричного гомогенізатора Glas-Col (США) в 1 мл охолодженого 0,05 М фосфатного буфера з 0,1 мМ ЕДТА (рН 7, 6).

В дослідну пробірку приливали 400 мкл проби та 2 мл реактиву С: 10 мл реактиву А (2 г Na_2CO_3 + 400 мг NaOH на 100 мл $\text{dist H}_2\text{O}$) + 200 мкл реактиву В (500 мг $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ на 100 мл).

В контрольну пробу замість досліджуваного білкового матеріалу додавали 400 мкл дистильованої H_2O . Через 10 хв в пробірки додавали 200 мкл реактиву Фоліна і залишали ще на 30 хв для розвитку забарвлення. Його інтенсивність вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda = 750$ нм. Кількість мікрограм білку визначали за допомогою калібрувального графіку.

Визначення активності каталази. Каталазну активність визначали за методом Аєбі [1]. Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2 , незруйнована частина перексиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс.

При концентраціях до 10 мкМ ферментативне руйнування перекису водню описується кінетикою реакції першого порядку, тобто спадаючою експонентою:

$$\text{ОЩ} = a \times e^{-k \times t}$$

Де:

ОЩ – оптична щільність

t – час

k – константа, що може бути використана, як прямий показник активності каталази.

У наших дослідах інкубаційна суміш містила 10 мМ перекису водню і білка з розрахунку 3 мкг білка супернатанта. Про активність каталази судили за швидкістю утилізації перекису водню, за зниженням концентрації якої стежили при довжині хвилі 240 нм щохвилини протягом 4-5 хв. Отримані дані вносили в комп'ютер і обчислювали константи експоненти, згідно рівняння. Активність

каталази виражали в мкмоль утилізованої H_2O_2 на 1 мг білка і 1 хв (мкмоль.мін-1.мг-1) і обчислювали за формулою:

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

Де:

A – активність каталази

k – константа експоненти

a – ОП перекису водню на початку реакції

m – концентрація білка в пробі в мг/мл

0,0394 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню

Визначення активності супероксиддисмутази (СОД). Активність супероксиддисмутази визначали за методом Mirsa [58]. Про активність СОД судили за ступенем інгібування окислення адреналіну. Активність СОД виражали в умовних одиницях з розрахунку на 1 мг білка і 1 хв (од.мін-1.мг-1). За одиницю активності СОД брали 50% інгібування окислення адреналіну.

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

Де:

T – % інгібування реакції

K_0 – зміна ОП за хв холостий проби

K – зміна ОП за хв вимірюваної проби

$$A = T / 50 / m$$

m – концентрація білка в пробі в мг/мл

Визначення концентрації ТБК-активних продуктів. Концентрацію ТБК-активних продуктів визначали в гомогенатах за методом Uchiyama [83].

Принцип методу заснований на визначенні інтенсивності забарвлення, що утворюється в ході реакції між малоновим діальдегідом (МДА) і ТБК, що протікає в кислому середовищі і при високій температурі. Утворений в результаті реакції

триметіновий комплекс, що містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК, має характерний спектр поглинання з максимумом при довжині хвилі 535 нм і визначається спектрофотометричним методом.

Визначення концентрації дієнових кон'югатів. У щільно притертий скляний гомогенізатор поміщали аліквоту, що містила 0,1 мг білка досліджуваного зразка, додавали 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 та гомогенізували 10 хв. Проби центрифугували (1000 g, 15 хв) у пробірках з притертою пробкою. Надосадову фракцію відбирали та додавали 0,5 мл дистильованої води для розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту.

Для визначення дієнових кон'югатів у хімічні пробірки відбирали по 0,3 мл гептанової фази, додавали 1,5 мл 96% етилового спирту, проби перемішували, вимірювали поглинання при $\lambda = 233$ нм на спектрофотометрі. Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховували, виходячи з величини молярного коефіцієнту екстинкції при 233 нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот, що дорівнює $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$ та виражали у нмолях на мг білка [121].

Визначення концентрації сульфгідрильних (SH) груп. Визначення низькомолекулярних SH-груп здійснювали за методом Елмана [18]. Метод ґрунтується на здатності 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБК) взаємодіяти із білок-зв'язаними та вільними SH-групами із утворенням тіонітрофенільного аніону (ТНФА), вміст якого пропорційний вмісту сульфгідрильних груп у пробі. Його визначають спектрофотометрично при $\lambda = 412$ нм.

Для визначення загального вмісту сульфгідрильних груп в пробу, яка містить 30 мМ трис-НСІ буфер з 1 мМ ЕДТА (рН = 8,0) вносять 0,3 мл білка та 0,2 мл 1,25% ДСН. Загальний об'єм проби становить 2,5 мл. Проби залишають на 15 хв при кімнатній температурі, після чого вносять 0,1 мл ДТНБК. Через 30 хв визначають екстинкцію дослідних проб при $\lambda = 412$ нм проти проби, що містить 2,3 мл трис-НСІ буфера з 1 мМ ЕДТА, 0,2 мл 0,1% ДСН та 0,1 мл ДТНБК. Концентрація SH-груп розраховується за калібрувальною кривою та виражається в ммоль на 1 мг білка.

Визначення активності глутатіонпероксидази. Активність GPx вимірювали за зменшенні рівня NADPH в сполученої глутатіонредуктазної реакції [65].

Інкубаційна суміш складалася з 0,05 М калій-фосфатного буфера (рН 7,6), 0,2 мМ відновленого глутатіону, 1 мМ NaN₃, 1 мМ ЕДТА, 0,075 мМ NADPH, 0,04 од. глутатіонредуктази і 0,3 мг білка супернатанта. Реакцію починали додаванням 0,2 мМ H₂O₂. У холосту проби додавали аналогічний обсяг буфера. За оптичною щільністю стежили при довжині хвилі 340 нм протягом 4-5 хв. Оптична щільність проб вносили в комп'ютер і по їх різниці обчислювали константу регресії. Активність ферменту обчислювали за формулою і виражали в нмоль окисленого NADPH на 1 мг білка і 1 хв (нмоль.мін⁻¹×мг⁻¹).

$$A = 1000 \times k / (6,22 \times m) \quad (1.5)$$

Де:

k – коефіцієнт регресії

6,22 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції НАДФН

m – концентрація білка в пробі в мг/мл

Визначення активності DT-діафрази. Активність NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази встановлювали в гомогенатах печінки в реакційній суміші, що містила NADPH-генеруючу глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну систему, менадіон (2-метил-1,4-нафтохінон) та МТТ (3-(4,5-диметилтіазо-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід). NAD(P)H-хінон-оксидоредуктаза каталізує NADPH-залежне відновлення менадіону в менадіол. Наступне утворення формазану внаслідок неензиматичного відновлення МТТ за дії менадіолу детектували на мікропланшетному рідері в діапазоні довжини хвиль 550–640 нм [67].

Визначення концентрації карбонільних груп. Ступінь окисної модифікації протеїнів (ОМП) оцінювали за вмістом карбонільних похідних протеїнів (кетон-2,4-динітро- фенілгідразонів) у присутності донорів електронів і металів змінної

валентності, на- самперед іонів заліза або міді. Зміни абсорбції реєстрували за допомогою автоматичного мікроспектрофотометра μ Quant (Biotek, США) [109].

1.4 Статистична обробка даних

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Origin Lab 8.0 та стандартного програмного пакету MsExcel на персональному комп'ютері. Результати представлено у вигляді $(M \pm m)$, де M — середнє значення величини, m — стандартна похибка середнього значення величини. Порівняння отриманих результатів морфометричних досліджень здійснювали за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Порівняння вибірок даних біохімічних показників здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента. У всіх випадках рівень статистичної значущості був встановлений на рівні $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 2

ГІСТОМЕТАБОЛІЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТРАВМАТИЧНО УШКОДЖЕНОГО НЕРВА ЗА УМОВ АУТОПЛАСТИКИ

2.1. Регенерація сідничого нерва на тлі аутопластики великого дефекту травматичного ушкодження та впливу клітинних суспензій на процеси відновлення

На сьогодні аутопластика великих дефектів нерва є «стандартом» хірургічного відновлення застарілих ушкоджень нерва. У літературі накопичилася велика кількість даних про оцінку різних способів аутопластики, ефективність відновлення нерва та ефекторного м'язу, реабілітації хворих. Разом з тим вдало проведена аутопластика нерва не завжди дає бажаний результат, що спонукало дослідників до застосування різних стимулюючих засобів. В першу чергу сфера наукових пошуків була спрямована на використання специфічних факторів росту, арсенал яких є досить дослідженим, а стимулюючий вплив щодо регенерації тканин доведеним. Проте технологічне отримання факторів росту людини (human growth factor) та фармакоєкономічні труднощі їх застосування спонукали фахівців до розробки різних аутологічних продуктів, що містять стимулюючі біологічні фактори і сприяють процесам регенерації.

Використання аутологічних продуктів швидко розширило можливості ортопедії в маніпулюванні факторами росту і секреторними білками, з метою поліпшення загоєння кісток, сухожилків і м'яких тканин. Клінічне застосування тканинних суспензій (тромбоцитарної плазми, жирової тканини) в таких галузях як щелепно-лицьова хірургія, пластична хірургія і загальна хірургія не дають можливість дослідити механізм та закономірності впливу аутологічних продуктів на процеси регенерації, тому багато з цих продуктів були вивчені в межах фундаментальних наукових дослідженнях.

На сьогодні в якості таких аутологічних продуктів запропоновано тромбоцитарну плазму, суспензію жирових клітин і мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку. У експериментальних дослідженнях показано стимулюючий вплив зазначених тканинних засобів на процеси проліферації та диференціації клітин сухожилків. На думку авторів застосування аутоплазми здійснює свій вплив через вивільнення тромбоцитами і жировими клітинами факторів росту (IGF-1, bFGF, PDGF, TGF- β та інші). Комбінації вивільнених факторів росту є джерелом місцевої регуляції посттравматичного відновлення. Крім того аутологічні клітинні суспензії не викликають імунні реакції, а їх використання в невисокій концентрації дозволяє активувати фізіологічний процес формування згортку та вивільнення факторів росту.

Використання підготованої суспензії клітин червоного кісткового мозку також сприяло регенерації ушкоджених тканин. Як зазначають автори, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку є потенціалом для мультилінійної диференціації.

Разом з тим, є дані про низькі показники виживання і онкогенність імплантованих мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, що може підірвати ефективність клітинної терапії. Використання додаткового мікросередовища, яким може бути аутологічна тромбоцитарна плазма, можливо дасть змогу подолати ці обмеження. Зважаючи на це метою даного дослідження було підтвердити ефект аутологічної тромбоцитарної плазми, суспензії клітин червоного кісткового мозку та їх комбінованого нанесення на процеси регенерації травмованого сідничого нерва та в якості засобу метаболічної підтримки денервованого м'язу. Використовуючи ці тканинні засоби у експериментальній роботі ми намагалися довести, що стимулювати нейро-м'язове відновлення можна шляхом використання аутологічних мезенхімальних клітин пацієнта, що дозволить у клінічних умовах вплинути на ендогенні процеси відновлення.

Для досягнення поставленої мети було проведено експериментальне моделювання дефекту сідничого нерва, його аутопластика та нанесення на зону ушкодження аутологічних клітинних суспензій. В подальшому було проведено

гістологічне дослідження сідничого нерва для оцінки рівня регенерації нерва та дослідження структури ефекторних скелетних м'язів на рівні гомілки для оцінки рівня гіпотрофічного процесу. Проте слід зазначити, що гістологічні методи дослідження дозволяють лише оцінити темпи розвитку та наслідки травматичного ушкодження досліджуваних анатомічних структур, але не дозволяють встановити механізм незадовільного результату відновлення. Для цього додатково було проведено аналіз основних біохімічних показників нерва і м'язу, які дозволяють оцінити метаболічні процеси на рівні ушкодження та пояснити механізм впливу суспензії жирових клітин та мезенхімальних клітин, отриманих із червоного кісткового мозку. Для кількісної оцінки регенеративного процесу в першу чергу проведено аналіз інтактного (контрольного, неушкодженого) нерва. Розглянемо отримані результати більш детально.

Гістологія сідничого нерва 1ої (інтактної) групи тварин представлена щільно організованими нервовими волокнами (мієліновими і безмієліновими), системою кровоносних мікросудин і стромальними елементами нерва. Архітектоніка останніх сформовані енд-, пери- і епіневрієм – системою колагенових волокон і фіброцитів, функціональна і просторова організація яких різко змінюється за умов травматичного ушкодження та інтоксикації.

На структурному рівні нерв вкритий епіневрієм, в якому локалізовані мікросудини малого та великого діаметру. Периневрій розділяє нерв на фасцикули. Поодинокі та групи нервових волокон оточені ендоневрієм. В ендоневрії локалізовані мікроциркуляторне русло, гемокапіляри орієнтовані вздовж вісі нерва.

Нервові волокна сідничого нерва представлені головним чином мієліновим типом, в яких перехвати Ранв'є реєструються з різним інтервалом, а муфти мієлінової оболонки мають різну товщину (рис. 2.1). На поперечному розрізі нерва нервові волокна округлої та видовженої форми. Нервові волокна в сідничому нерві контрольної групи тварин локалізовані вздовж вісі нерва, часто мають звивистість. Реєструються лише окремі функціонально активовані

нейролемоцити. Морфометричне дослідження показало, що кількісна щільність нервових волокон в інтактному нерві становила $9601,0 \pm 285,5$ од/мм³ (табл. 2.1).

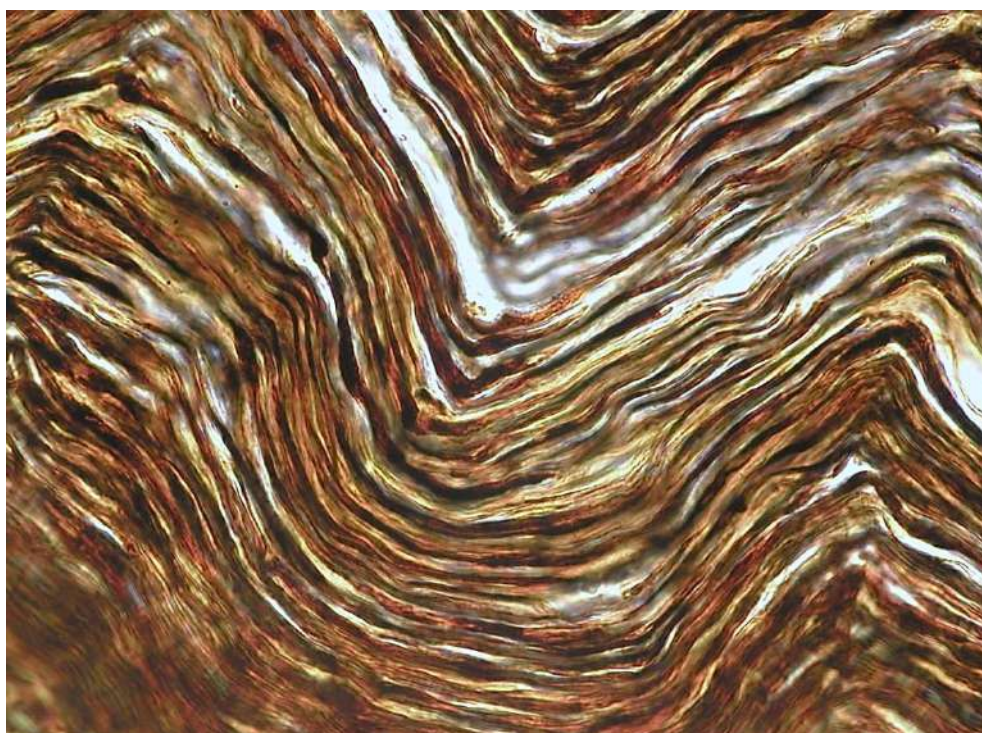


Рис. 2.1 Сідничий нерв 1ої (інтактної) групи. Нервові волокна щільно орієнтовані в тканині нерва, без ознак дегенерації, лейкоцитарної інфільтрації. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

Гістоструктура нерва 2ої групи- після аутопластики мала іншу архітектоніку. На 4 тиждень після аутопластики сідничого нерва зона ушкодження характеризувалася відновленням анатомічної будови нерва, чітко реєстрували проксимальний і дистальний шви, сегмент пластики нерва. На гістологічному рівні фасцикули проксимального і дистального сегментів, зона аутопластики суттєво розрізнялися. Епіневрій нерва в тварин дослідної групи представлений товстою смугою щільної сполучної тканини, особливо в ділянці епіневрального шва. Кількісна оцінка щільної сполучної тканини навколишнього нерви є досить суб'єктивною, проте загальна морфологічна оцінка вказує на суттєвий розвиток ніжної фіброзної тканини навколо дистального шва. Проксимальний сегмент на макрорівні був схожий до нерва інтактних тварин, сегмент аутопластики дефекту

нерва характеризувався значними посттравматичними регенеративними змінами, збільшенням об'єму сполучної тканини, в тому числі васкуляризації шва і поява жирової тканини. Дистальний сегмент ушкодженого нерва характеризувався зменшенням оптичної щільності тканини нерва від дистального шва до терміналей нерва. Морфологічних ознак запального процесу не виявлено.

Кількісний розподіл нервових волокон, рівень їх регенерації у різних відділах травмованого нерва суттєво відрізнялись. Епіневрій проксимального сегмента містив збільшену щільність активованих фібробластів та колагенових волокон, відмічено розростання жирової тканини, значну кількість стазованих мікросудин. Нервові волокна орієнтовані кластерами, їх щільність зменшена порівняно до інтактного нерва, реєструються активовані ізольовані нейролемоцити, овоїди дегенерації ушкоджених осьових циліндрів. Між нервовими волокнами локалізовані пучки сполучної тканини, що є результатом реорганізації ендоневрію та розростання периневрію (рис. 2.2). Рівень імпрегнації нервових волокон суттєво нижчим, що є проявом зменшення білкового і ліпідного обміну. Муфти мієлінової оболонки нервових волокон меншого діаметру і довжини, що є проявом демієлінізації одних та ремієлінізації інших осьових циліндрів. Щільність нервових волокон становила $4895,1 \pm 331,7$ од/мм³ (50,9% від контролю, $p < 0,05$) (табл. 2.1).

Різно виражену зміну архітектоніки нерва відмічено в ділянці проксимального шва хірургічно відновленого нерва. Навколо шва нервові волокна регенерували лише поодинокими кластерами, що обумовлено значною активацією проліферації дедиференційованих нейролемоцитів і формуванням гліально-фібробластного рубця (рис. 2.3). Нейролемоцити орієнтовані кластерами вздовж вісі нерва у вигляді так званих стрічок Бюнгнера, що свідчить про ранні етапи регенераційного процесу. Епіневрій в цій ділянці нерва характеризувався збільшенням васкуляризації та щільності пучків колагенових волокон, фібробластів і адипоцитів.

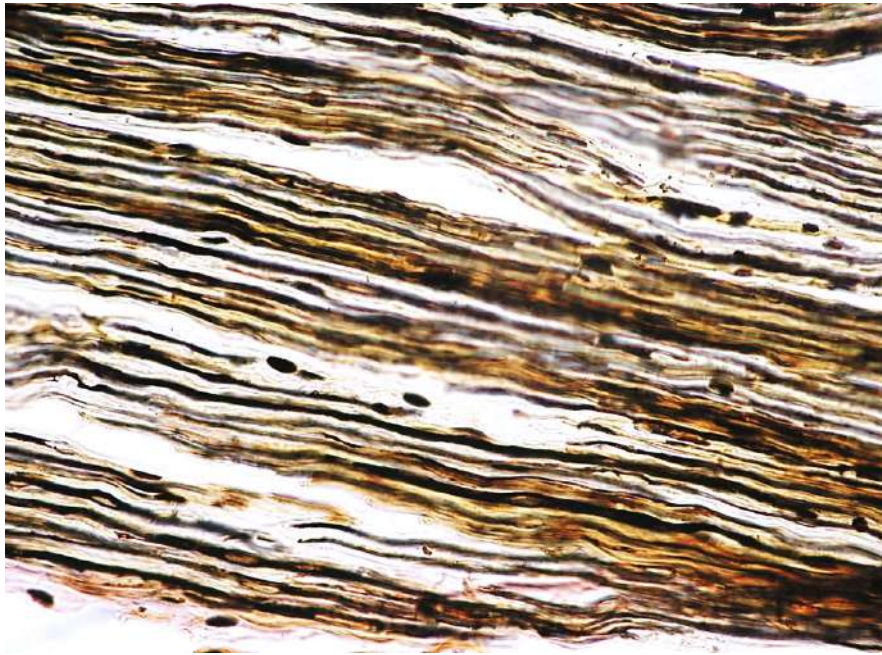


Рис. 2.2 Проксимальний сегмент сідничого нерва дослідної групи 2 після аутопластики. Фрагментація і зменшення щільності нервових волокон, активація нейролемоцитів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

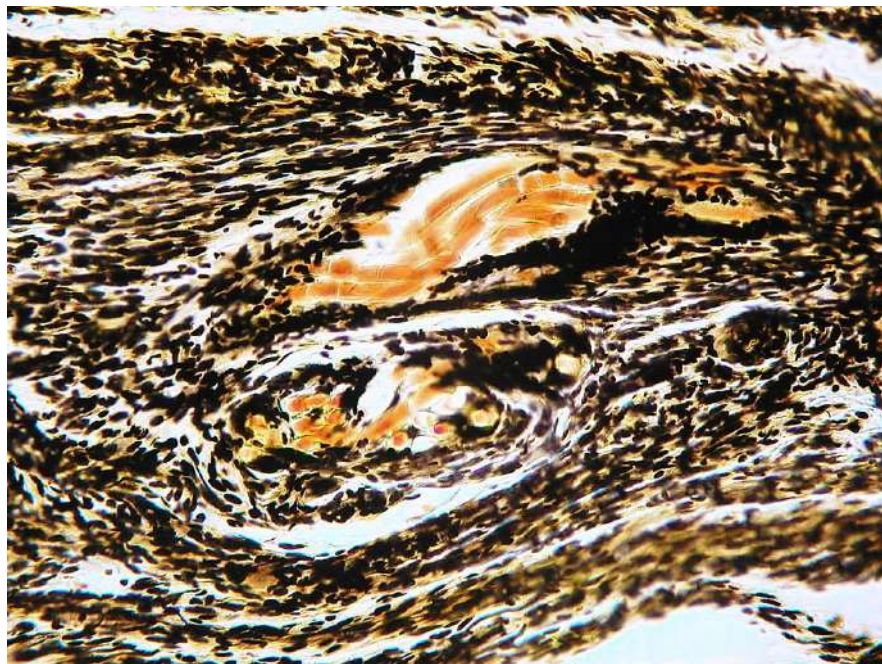


Рис. 2.3 Регенерація сідничого нерва дослідної групи 2 після аутопластики. Проксимальний шов травмованого нерва. Утворення гліального рубця навколо шва, проліферація нейролемоцитів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

В ділянці аутопластики сідничого нерва реєстрували зміни, що можна охарактеризувати як регенераційну неврому, об'єм якої суттєво відрізнявся між тваринами дослідної групи. Гістоструктура фрагмента аутопластики була досить гетероморфною, хоча і не втрачала основні ознаки організації нерва. Досліджуваний фрагмент нерва містив щільний епіневрій, численні розгалужені кровоносні судини, активовані нейроремоцити, що локалізовані між колагеновими мембранами ендоневрію (рис. 2.4). Сполучнотканинні елементи епіневрію контактували та переходили в оточуючу жирову тканину. В полі зору реєстрували лише поодинокі кластери регенеруючих нервових волокон, які не досягали дистального шва аутопластики. Середня щільність нервових волокон становила $1501,0 \pm 121,1$ од/мм³ (15,6% від контролю, $p < 0,05$) (табл. 2.1).

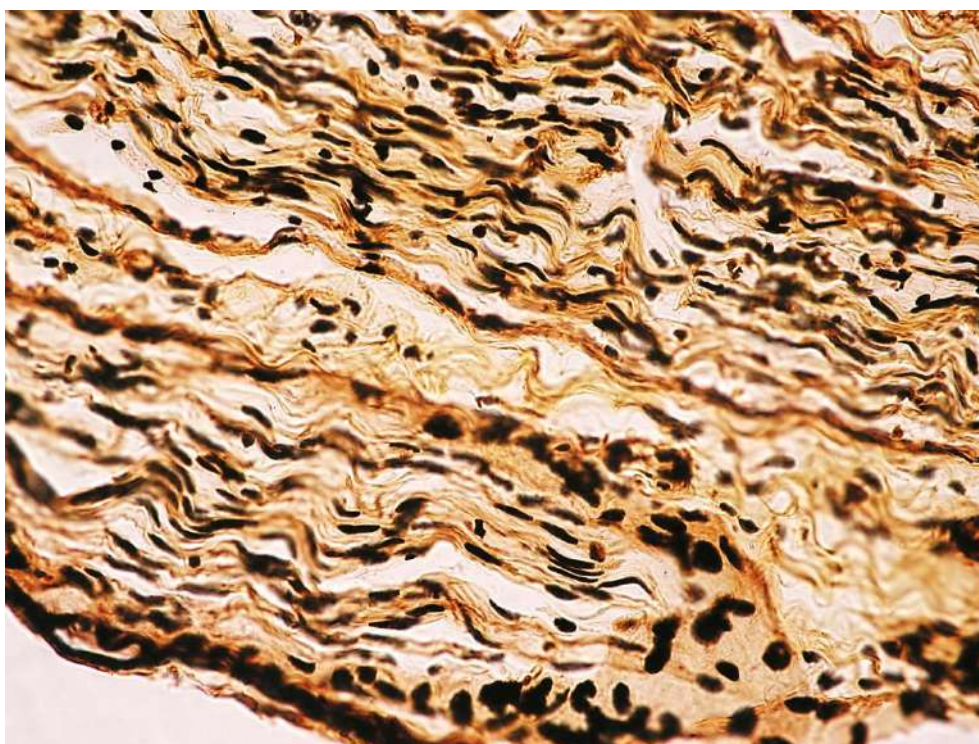


Рис. 2.4 Фрагмент аутопластики сідничого нерва дослідної групи 2 після ушкодження. В сегменті нерва реєструються пучки колагенових волокон, активовані нейроремоцити. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

Ділянка дистального шва характеризувалася посттравматичною активацією нейроремоцитів, інкапсуляцією шва, реорганізацією сполучної тканини нерва.

Продуктів (дериватів) розпаду нервових волокон не реєстрували, що вказує на їх повну елімінацією з тканини нерва. Регенеруючих нервових волокон не реєстрували (рис. 2.5).

Морфологічна картина дистального сегмента не мала суттєвої різниці за темпами посттравматичної регенерації із сегментом аутопластики. Епіневрій мав ознаки кількісного збільшення сполучної і жирової тканини, посттравматичною регенерацією мікросудин. Центральна зона дистального сегмента нерва заповнена нейролемоцитами, колагеновими мембранами і гемокапілярами (рис. 2.6). Ознак валлерівської дегенерації у дистальному сегменті не реєстрували. Таким чином, ділянка аутопластики нерва мала ознаки незавершеної регенерації, що характеризується незадовільними темпами проростання осьових циліндрів, компенсаторною активацією дедиференційованих нейролемоцитів і заміщенням цих елементів нерва сполучною тканиною.

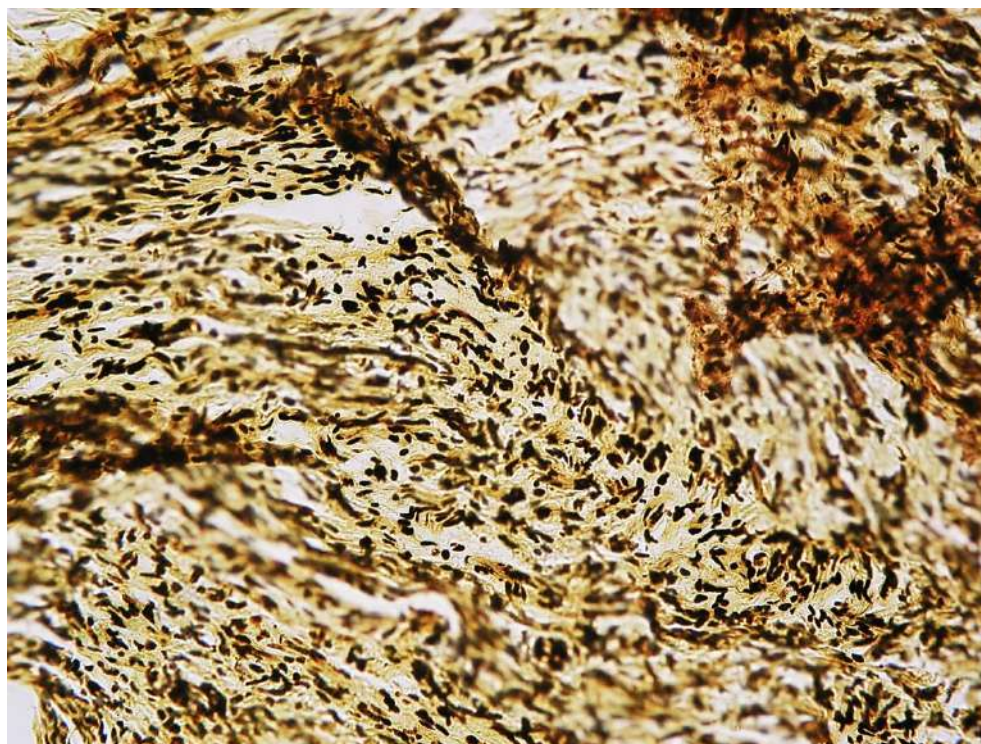


Рис. 2.5 Гліальних рубець в ділянці дистального шва травмованого сідничого нерва (група 2) після аутопластики. Активація і проліферація нейролемоцитів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

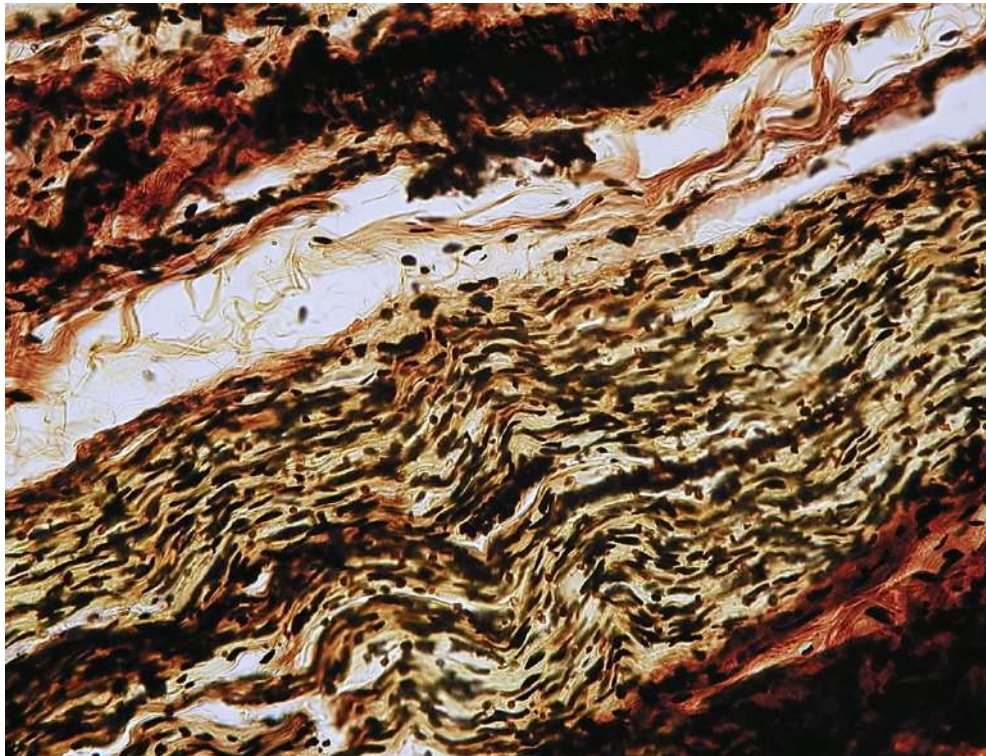


Рис. 2.6 Дистальний сегмент травмованого сідничого нерва (група 2) після аутопластики. Активовані нейроремоцити, структурні зміни епінєврїю, кластери мікроросудин. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

Таблиця 2.1

Регенерація нервових сідничого нерва після аутопластики

Група/сегмент	Щільність нервових волокон, од/мм ³		
	Проксимальний	Аутопластика	Дистальний
Контроль (Група 1)	9601,0±285,5		
Пластика (Група 2)	4895,1±331,7a	1501,0±121,1a	–
ТЖТ (Група 3)	6693,7±269,8a,b	3029,0±206,8a,b	–
ТКМ (Група 4)	7004,7±350,6a,b	3245,4±200,5a,b	851,9±54,3a,b
Комплекс (Група 5)	7586,2±456,1a,b	3786,3±210,7a,b,c,d	906,0±54,4a,b,c

Примітка: ТЖТ – трансплантація жирової тканини; ТКМ – трансплантація кісткового мозку; a – достовірно до контролю ($p < 0,05$); b – достовірно до травми ($p < 0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p < 0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p < 0,05$)

Вплив ТЖТ на регенерацію сідничого нерва (група 3). Через 30 діб після аутопластики великого дефекту сідничого нерва та ТЖТ в 3ій групі реєстрували поліморфізм посттравматичної регенерації різних досліджуваних сегментів нерва. Макроскопічно виділені зони нерва (проксимальний, дистальний сегменти і зона аутопластики) чітко розрізнялись. Ділянка нанесення жирової тканини за об'ємом сполучної тканини суттєво відрізнялась від невроми дослідної групи 2 без ТЖТ: збільшилося розростання сполучної тканини, утворення «ніжного» епіневрію, проростання жирової тканини між фасцикулами нерва. У гістологічних зрізах сідничого нерва встановлено значне поліпшення і прискорення проростання фасцикул ушкодженого нерва в дистальний сегмент порівняно із основною дослідною групою. В проксимальному сегменті встановлено активацію регенерації мікросудин і нервових волокон, їх щільність суттєво збільшилась. Нервові волокна, представлені регенеруючими аксонами і дендритами, проростають вздовж ремодельованого ендоневрію і периневрію. Нервові волокна були гіперімпрегнованими, що свідчить про активацію ремієлінізації (рис. 2.7). Разом з тим більшість волокон мали неправильний напрям регенерації вздовж прокольної вісі нерва. Це можна пояснити значний фокальним розростанням ендоневральної тканини, що створює тканинні бар'єри на шляху регенерації нерва. Виражений ендоневральний фіброз і «спайки» виявлено навколо шва і прилеглої тканини нерва. Незважаючи на це морфологічна структура нерва вказує на більший рівень регенерації нервових волокон і збільшення васкуляризації порівняно із основною дослідною групою 2.

Реєстрували окремі муфти мієліну. Активовані нейролемоцити заповнювали проміжки травмованих і дегенерованих осьових циліндрів. Середня щільність нервових волокон становила $6693,7 \pm 269,8$ од/мм³ (69,7% від контролю, $p < 0,05$), що достовірно більше групи 2 на 19% (табл. 2.1).

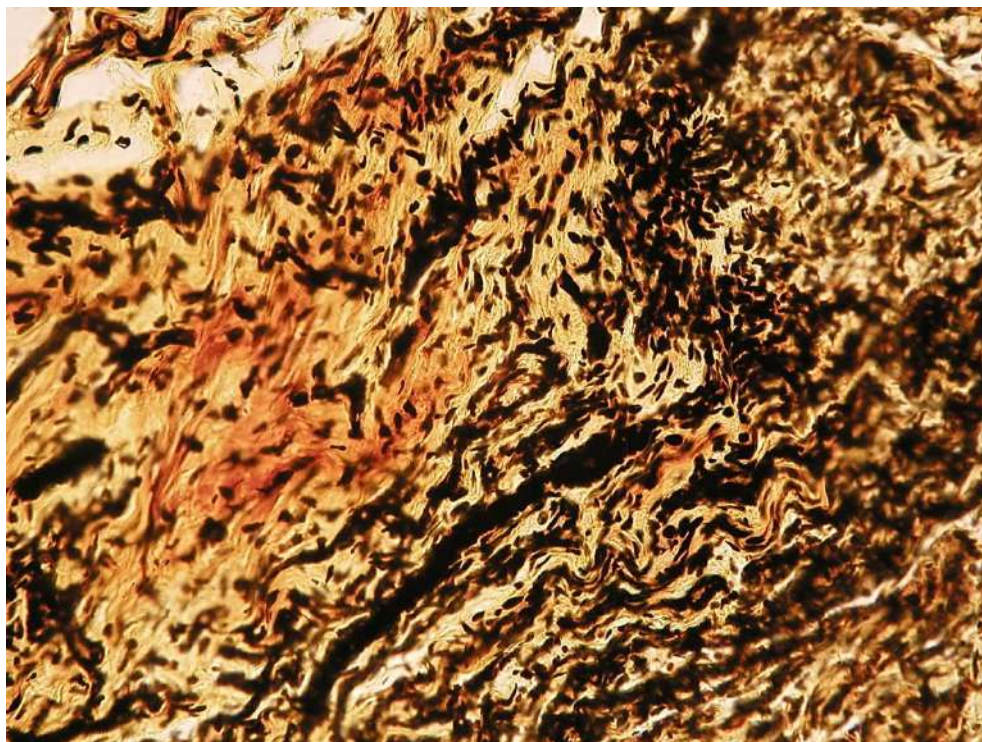


Рис. 2.7 Проксимальний шов травмованого сідничого нерва після аутопластики і ТЖТ (група 3). Активація регенерації мікросудинного русла, активовані нейролемоцити. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

В ділянці проростання нервових волокон в сегмент аутопластики, тобто проксимального шва, кластери нервових волокон огинали інкапсульований шов і проростали до дистального шва. Нервові волокна мали звивисту контур, були гіперімпрегнованими, орієнтовані вздовж вісі нерва, контактували з чисельними нейролемоцитами (рис. 2.8).

Інтерстиційна тканина сегмента аутопластики нерва представлена нейролемоцитами і фібробластами, між фасцикулами нерва відмічено фокальні островці жирової тканини, що може свідчили про penetрацію адипоцитів в тканину структурно зміненого нерва. Встановлено достовірне збільшення середньої щільності нервових волокон в ділянці аутопластики до $3029,0 \pm 206,8$ од/мм³ ($p < 0,05$), що майже в 2 рази більше порівняно з групою 2.

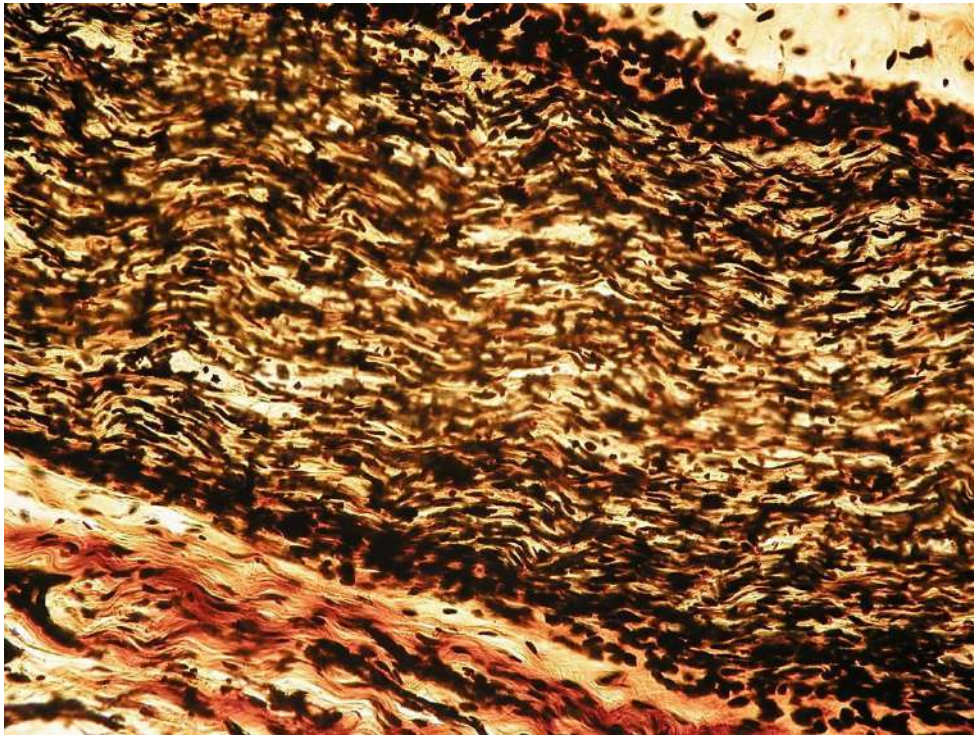


Рис. 2.8 Фрагмент аутопластики сідничого нерва після ушкодження і ТЖТ (група 3). Збільшення кластерів активованих нейролемоцитів, майже непорушений епіневрій. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

В ділянці дистального шва відмічено значну щільність колагенових мембран, активованих нейролемоцитів, мікросудин, реєстрували поодинокі регенеруючі осьові циліндри (рис. 2.9).

Дистальний сегмент нерва характеризувався збільшенням товщини епіневрію, міграцією активованих фібробластів, стазованими мікросудинами (рис. 2.10). Основний об'єм тканини досліджуваної зони представлений нейролемоцитами, регенерації нервових волокон не встановлено.

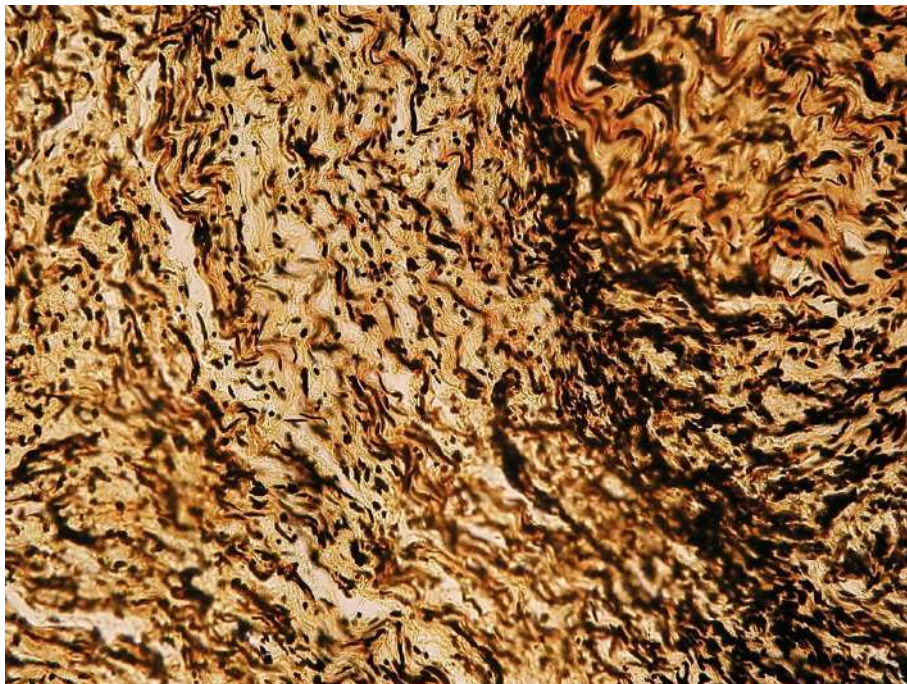


Рис. 2.9 Активація нейролемоцитів, регенерація мікросудинного русла в ділянці дистального шва травмованого сідничого нерва після аутопластики і ТЖТ (група 3). Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

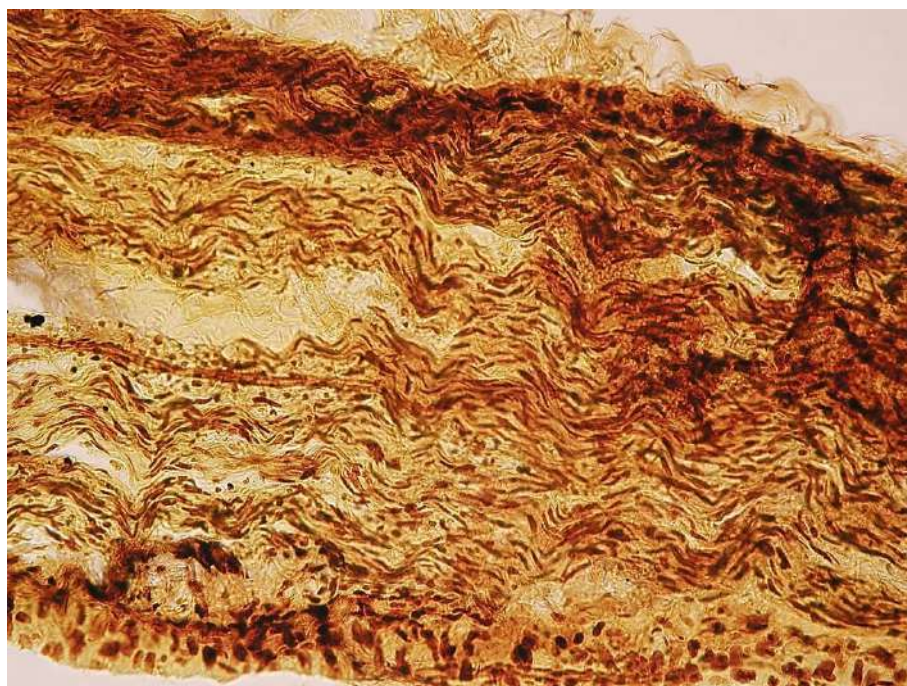


Рис. 2.10 Дистальний сегмент травмованого сідничого нерва після аутопластики і ТЖТ (група 3). Активація фіброblastів епінєврїю, регенерація гемокапілярів нерва, активація нейролемоцитів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

Узагальнюючи результати гістологічного та морфометричного дослідження можна стверджувати про активацію процесів регенерацію нервових волокон крізь сегмент аутопластики травмованого нерва, penetрацію адипоцитами ділянок ушкодженого епіневрію, активацію нейролемоцитів. Збільшення активованих і дедиференційованих нейролемоцитів в результаті нанесення клітин жирової тканини суттєво вплинуло на зону шва нерва. На думку авторів, жирова тканина містить велику кількість стромальних стовбурових клітин [114], які безпосередньо пенетрують тканину травмованого сідничного нерва, активують ангиогенез, метаболічний потенціал ендотелію мікросудин, нейролемоцитів, що впливає на регенерацію нервових волокон.

Вплив ТКМ на регенерацію травмованого сідничного нерва (група 4). При дослідженні сідничного нерва після аутопластики і ТКМ засвідчили відновлення анатомічної цілісності нерва і виражені реорганізаційні процеси на гістологічному рівні. У проксимальному сегменті епіневрії мав значну кількість мікросудин, активованих фібробластів. Відмічено суттєве збільшення щільності нервових волокон та їх діаметр порівняно із групою 2. Нервові волокна були гіперімпрегованими, реєстрували чисельні муфти мієліну, що засвідчило активацію регенерації та ремієлінізації осьових циліндрів після ТКМ (рис. 2.11). Щільність нервових волокон в проксимальному сегменті становила $7004,7 \pm 350,6$ од/мм³ (72,9% від контролю, $p < 0,05$).

В зоні регенерації нервових волокон в проксимальний шов кластери осьових циліндрів огинали інкапсульований нейролемоцитами шов. Реєстрували активацію нейролемоцитів, що на цитологічному рівні проявлялося суттєвим збільшенням об'єму ядер клітин (рис. 2.12, рис. 2.13).

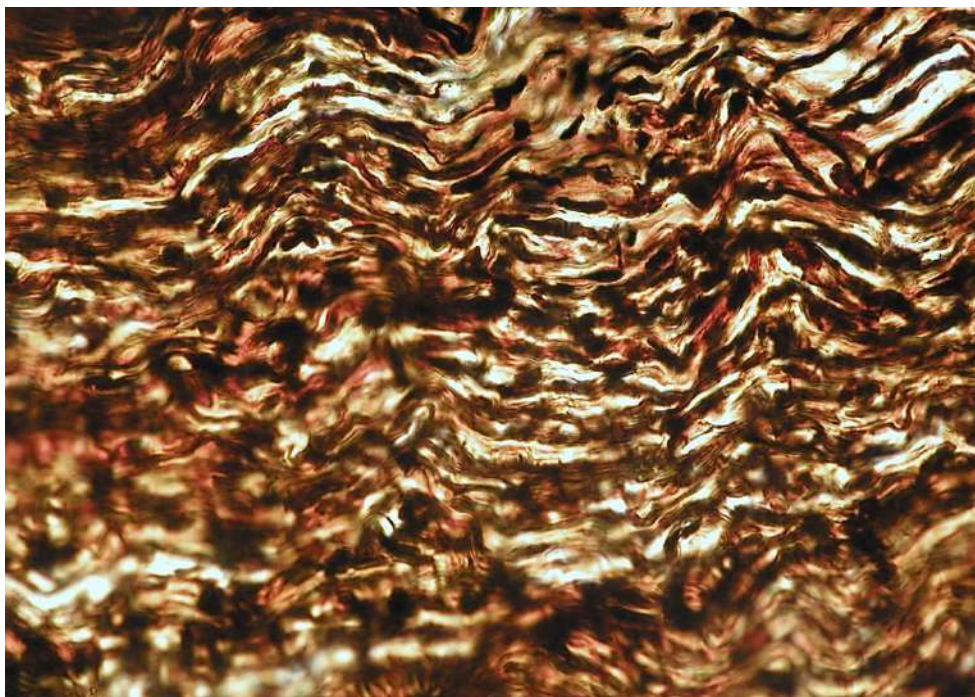


Рис. 2.11 Проксимальний сегмент сідничого нерва дослідної групи 4 після аутопластики і ТКМ. Фрагментація і зменшення щільності нервових волокон, активація нейролемоцитів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

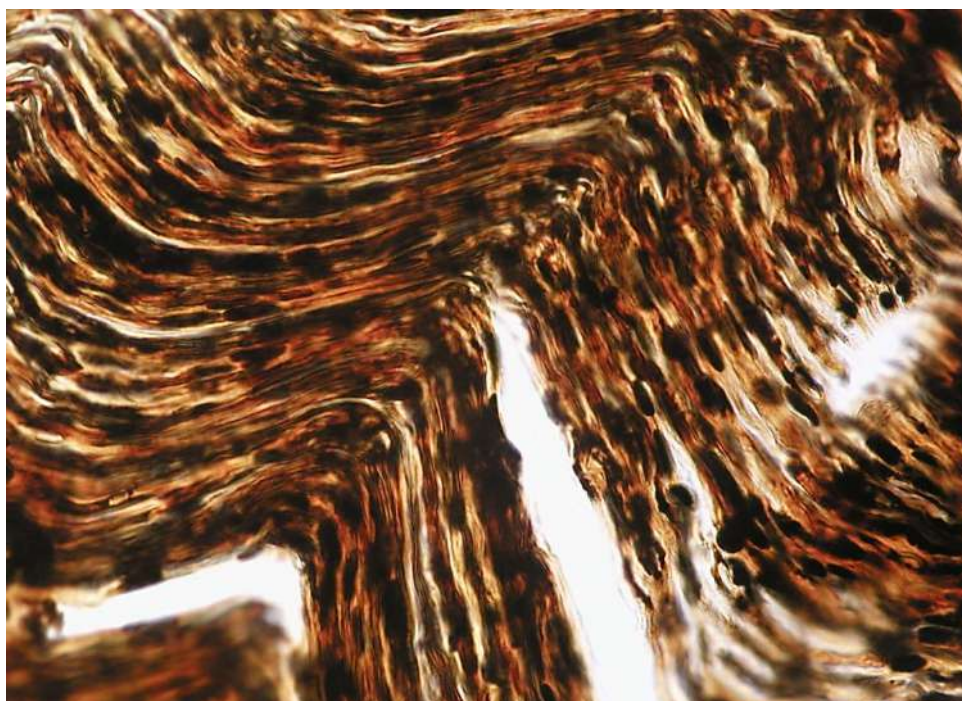


Рис. 2.12 Фрагмент аутопластики сідничого нерва після аутопластики і ТКМ (група 4). Регенерація кластерів нервових волокон, відновлення нейрогліальних взаємодій. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

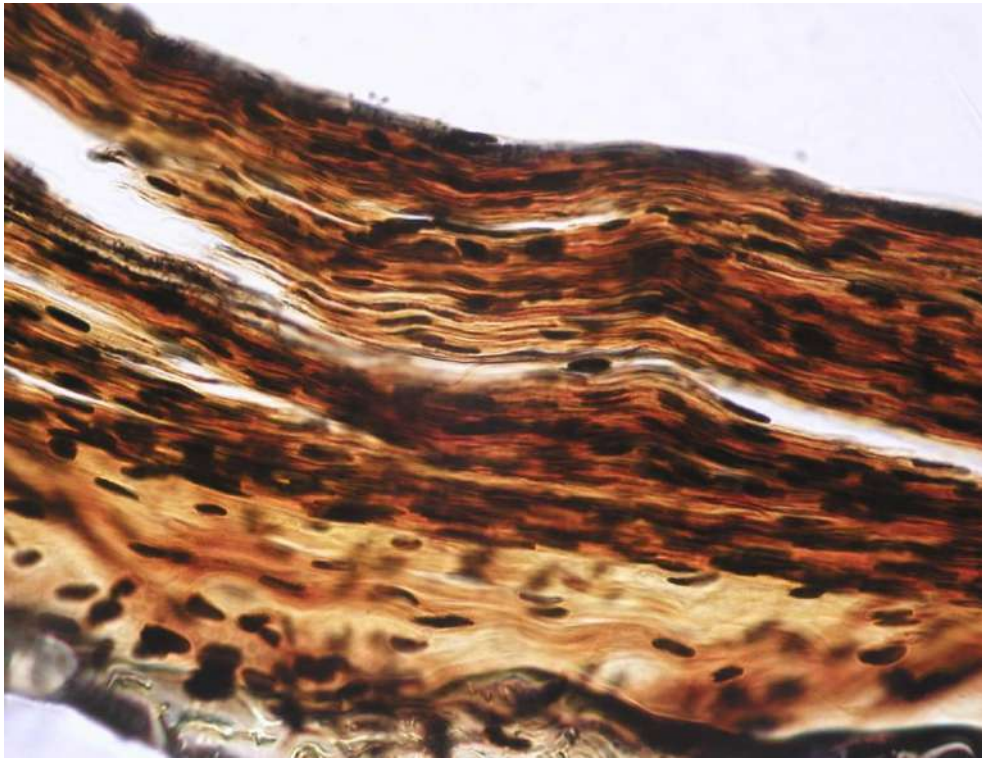


Рис. 2.13 Регенерація поодиноких нервових волокон в ділянці дистального сегмента зони аутопластики на тлі ТКМ (група 4). Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

Нервові волокна регенерували досить рівномірно, без формування рекурентних волокон. Епіневрій сегмента аутопластики містив значну кількість кровоносних судин, активовані фібробласти і поодинокі нервові волокна.

Навколо дистального шва локалізовані нейролемоцити і фібробласти, поодинокі кластери нервових волокон (рис. 2.14). Щільність нервових волокон в зоні аутопластики становила $3245,4 \pm 200,5$ од/мм³ (33,8% від контролю, $p < 0,05$), тобто мала тенденцію до збільшення темпу регенерації порівняно із групою 3 аутопластики з ТЖТ.

Дистальний сегмент нерва характеризувався регенерацією поодиноких нервових волокон і зменшенням щільності дедиференційованих нейролемоцитів, що свідчить про відновлення нейро-гліальних взаємодій і зменшення рівня гліальною компенсації (рис. 2.15).

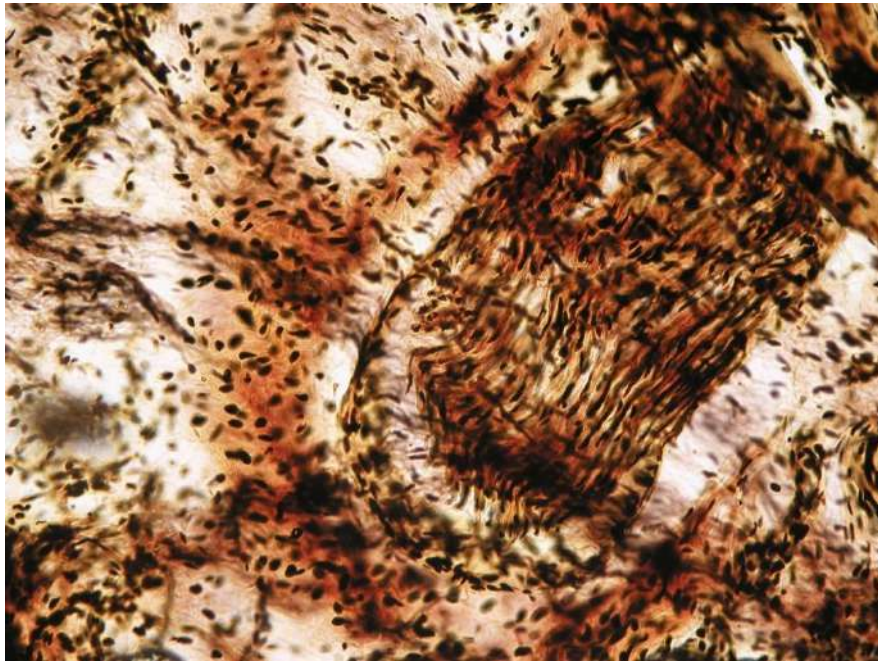


Рис. 2.14 Зменшення рівня формування гліального рубця в ділянці дистального шва, регенерація пучка нервових волокон в дистальний сегмент травмованого сідничого нерва після аутопластики і ТКМ (група 4). Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

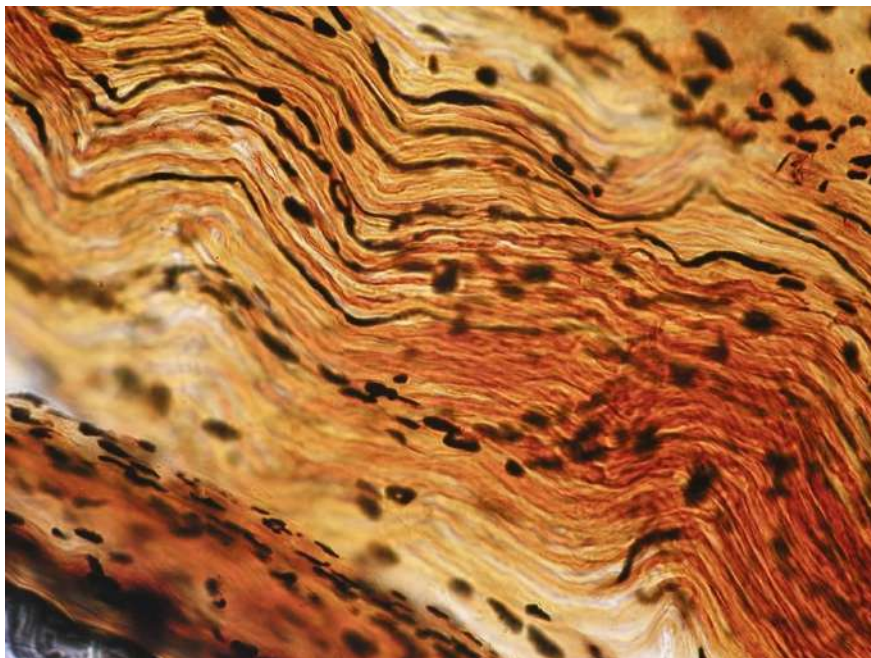


Рис. 2.15 Дистальний сегмент травмованого сідничого нерва після аутопластики і ТКМ (група 4). Регенерація дистального сегмента нерва, поодинокі нервові волокна. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

Середній рівень регенерації в дистальний відділ становив $851,9 \pm 54,3$ од/мм³ (8,8% від контролю, $p < 0,05$). Дериватів дегенерованих осьових циліндрів і гліоцитів не реєстрували.

Таким чином, за умов ТКМ відбувалась активація регенерації нервових волокон і відновлення цитологічних і метаболічних взаємодій між осьовими циліндрами і нейролемоцитами, зменшення ступеню гліальною організацією в ділянці аутопластики, що зменшило бар'єри на шляху проростання нервових волокон.

Регенерація сідничого нерва після аутопластики і ТЖТ з ТКМ (група 5). Аналіз гістологічного дослідження сідничого нерва в групі 5 після аутопластики і комбінованої ТЖТ з ТКМ показало деякі відміни щодо ізольованого застосування запропонованих підходів. Зокрема, відмічено виражену функціональну активацію нейролемоцитів, проростання нервових волокон в дистальний сегмент нерва і рівень їх ремієлінізації.

В проксимальному відділі епіневрій потовщений, збільшилась кількісне співвідношення фібробластів та мікросудин. Превалуюча більшість нервових волокон були мієліновими, проте мали різний діаметр. Реєстрували лише поодинокі вільні нейролемоцити (рис. 2.16). Середня щільність нервових волокон в проксимальному відділі становила $7586,2 \pm 456,1$ од/мм³ (79,0% від контрольного показника, $p < 0,05$), тобто відмічено тенденцію збільшення ступеня відновлення проксимального сегмента нерва після аутопластики.

В ділянці проксимального шва і сегмента аутопластики встановлено функціонально активовані нейролемоцити, що оточували зону шва і дифузно заповнювали тканину нерва (рис. 2.17, рис. 2.18, рис. 2.19). Нервові волокна перфоровали посттравматичну гліальні тканину і проростали в дистальний відділ нерва. Кластери регенеруючих осьових циліндрів супроводжували кровоносні судини різного діаметру.

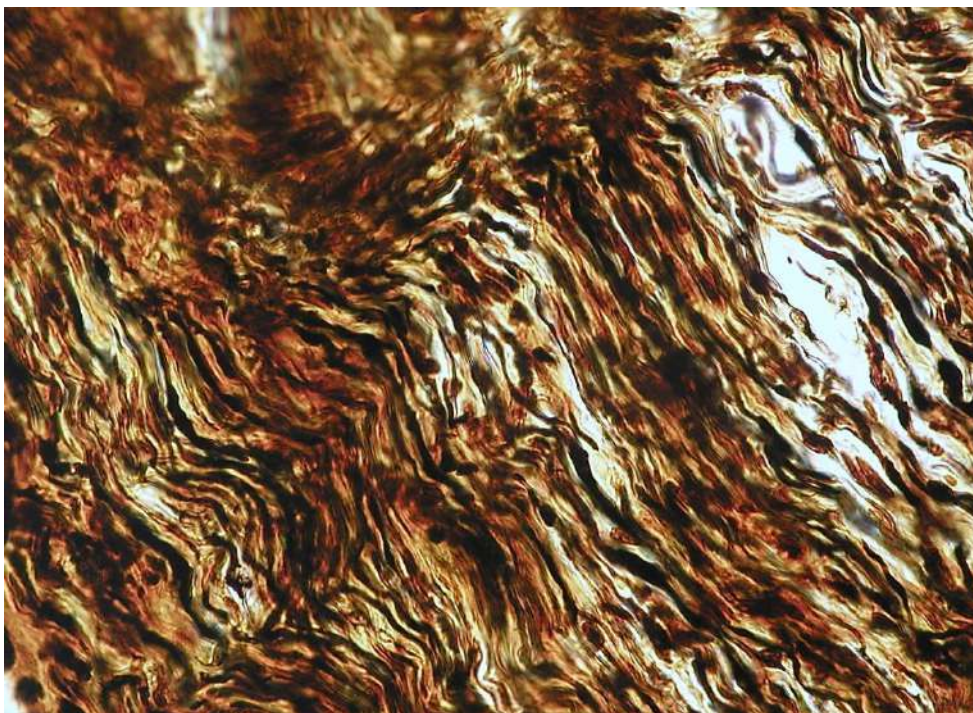


Рис. 2.16 Проксимальний сегмент сідничого нерва дослідної групи після аутопластики, ТЖТ і ТКМ (група 5). Регенерація нервових волокон, активовані нейролемоцити. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

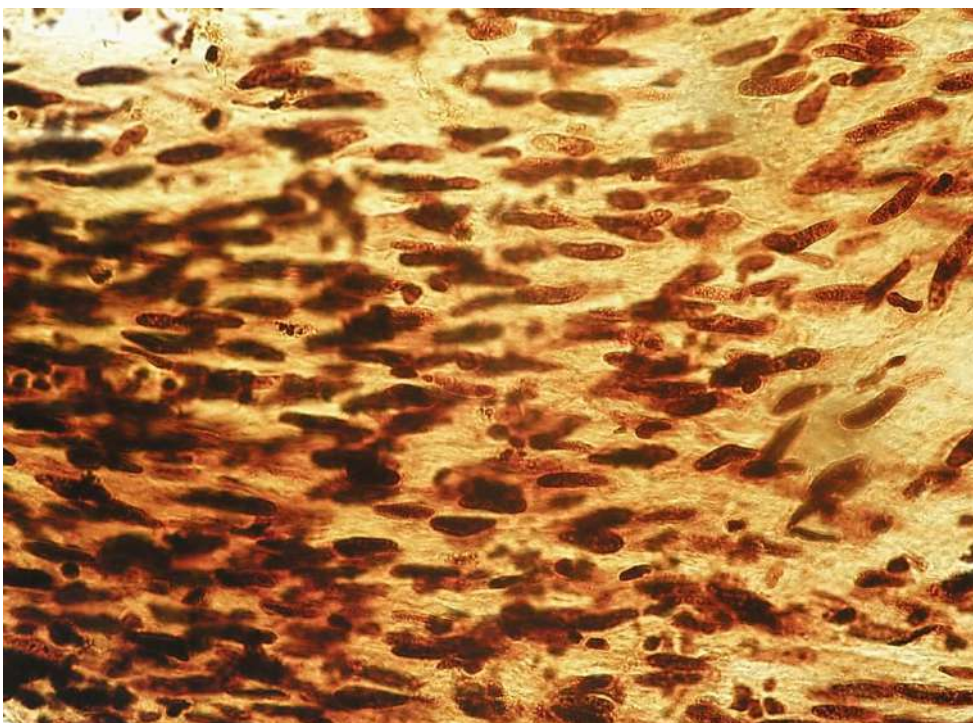


Рис. 2.17 Активовані нейролемоцити в сегменті аутопластики сідничого нерва після аутопластики, ТЖТ і ТКМ (група 5). Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

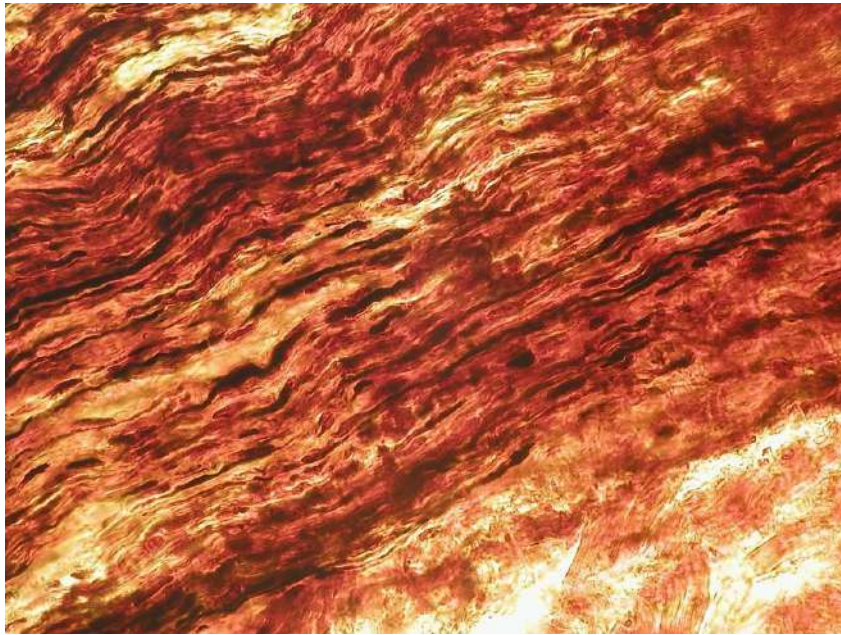


Рис. 2.18 Ділянка аутопластики сідничого нерва після аутопластики, ТЖТ і ТКМ (група 5). Кластери регенеруючих нервових волокон, відновлення нейрогліальних взаємодій, збільшення пучків колагенових волокон. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

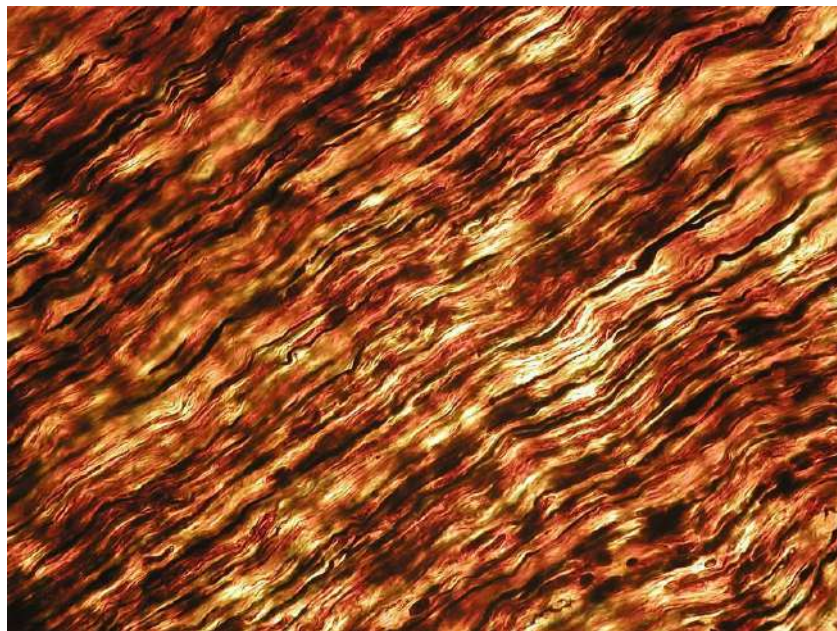


Рис. 2.19 Ділянка аутопластики сідничого нерва після аутопластики, ТЖТ і ТКМ (група 5). Регенерація нервових волокон. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

Ступінь регенерації нерва був на рівні $3786,3 \pm 210,7$ од/мм³ (39,4% від контрольного показника, $p < 0,05$), що достовірно більше від ізольованої ТЖТ або ТКМ.

В ділянці переходу неврони в дистальний сегмент пучки нервових волокон змінювали напрям проростання, часто реєстрували рекурентні волокна, а інші перфоровали дистальний гліальний рубець проросли в строму дистального сегмента ушкодженого нерва. Рівень регенерації у дослідних тварин відрізнявся: середня кількість нервових волокон становила $906,0 \pm 54,4$ од/мм³ (9,4% від контрольного показника, $p < 0,05$), а довжина регенерації була в межах 5-12 мм від дистального шва. Нервові волокна формували незначні кластери, між якими локалізовані елементи сполучної тканини (рис. 2.20, рис. 2.21), мали звивисту морфологію, мали різний рівень мієлінізації, реєстрували поодинокі рекурентні волокна.

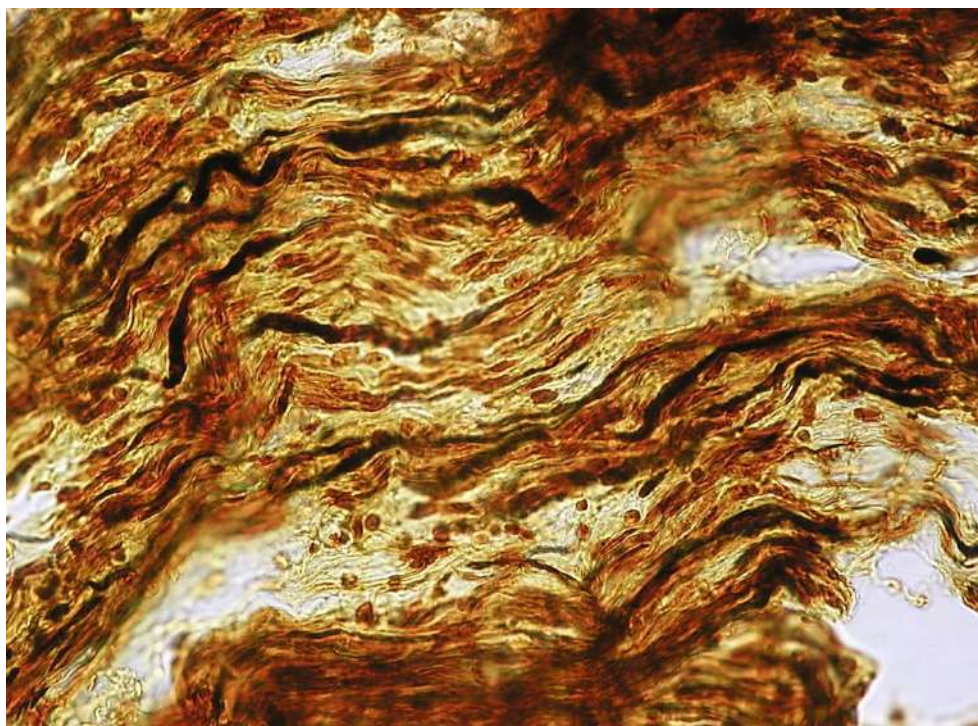


Рис. 2.20 Ділянка дистального шва сідничого нерва після аутопластики, ТЖТ і ТКМ (група 5). Поодинокі регенеруючі нервові волокна, активовані нейролемоцити, пучки колагенових волокон. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

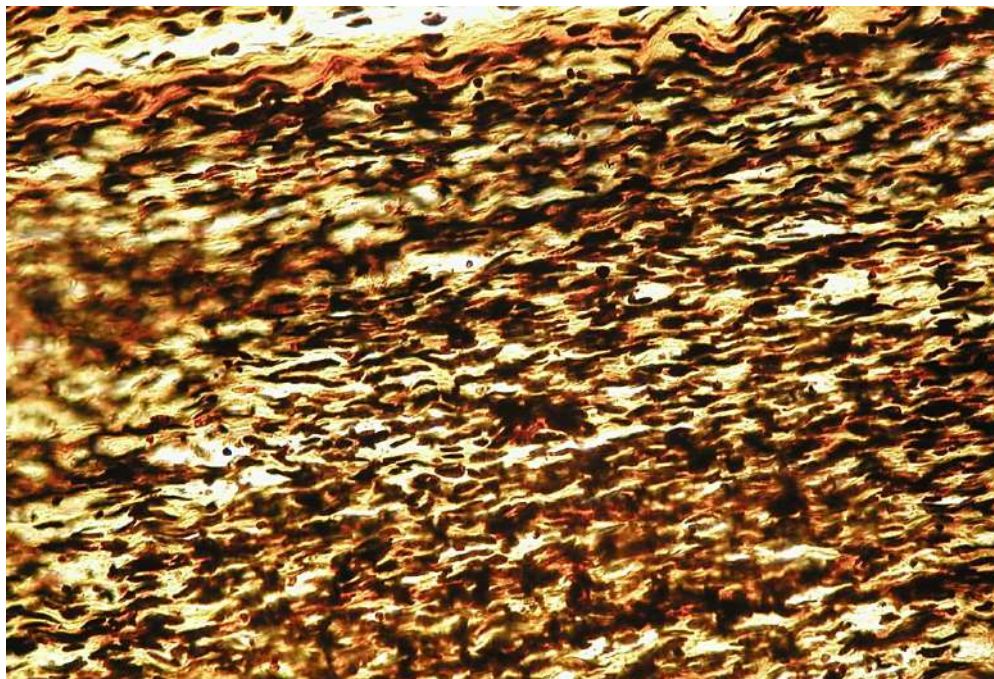


Рис. 2.21 Дистальний сегмент травмованого сідничого нерва після аутопластики, ТЖТ і ТКМ (група 5). Активовані нейролемоцити, ремоделювання нерва. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10

Вся інша тканина дистального сегмента була представлена реорганізованою гліальною і сполучною тканиною в межах структурно незміненого епіневрію.

Таким чином, аутопластика великого дефекту сідничого нерва дозволила забезпечити часткову регенерацію травматично ушкодженого нерва. При цьому ТЖТ сприяла зменшенню реорганізації і розростання щільної сполучної тканини в сегменті аутопластики, що сприяло проростанню осьових циліндрів в дистальний шов. ТКМ суттєво активувала регенерацію осьових циліндрів і нейролемоцитів, що вказує на цитотрофічну підтримку бластних клітин на посттравматичний репаративний процес. Комбінації ТЖТ і ТКМ забезпечила більший рівень регенерації нерва, проте лише ініціювало регенерацію в дистальний сегмент нерва.

Висновки до розділу 2.1. Наші результати показали, що ТЖТ і ТКМ в групі 5 мають нейротрофічний ефект щодо регенерації периферійного нерва після травми. Встановлено значне збільшення кількості мієлінових нервових волокон у

сегменті аутопластики, а при застосуванні ТКМ додатково зареєстровано регенерацію осьових циліндрів у дистальній відділ, що вказувало на безпосередній стимулюючий вплив мезенхімальних клітин, отриманих із кісткового мозку на процеси відновлення нерва. Ці дані узгоджуються з раніше отриманими результатами впливу тромбоцитарної плазми та нейротрофічних факторів росту, проте на відміну від інших досліджень нашу результати дозволили провести порівняльну терапевтичну ефективність суспензій жирової тканини і кісткового мозку, що є новинного нашого дослідження. Конкретний механізм активації регенерації пошкодженого нерва можна пояснити виділенням мезенхімальними клітинами факторів росту. Опосередкована дія аутологічних клітинних суспензій має позитивну роль у відновленні нейро-м'язових взаємодій, що доведено проведеними гістологічними та морфометричними дослідженнями. На морфологічному рівні нами вдалось лише кількісно оцінити рівень відновлення нерва, а для визначення метаболічної активації аутологічними суспензіями було проведено порівняльний аналіз про- та антиоксидантний профіль ушкодженого нерва після аутопластики. Результати досліджень наведено у наступному підрозділі.

2.2. Метаболічні зміни ушкодженого сідничого нерва після аутопластики і трансплантації

Розвиток окиснювального стресу і наступне перекисне окиснення структурних компонентів клітин (ліпідів плазматичних мембран, білків та нуклеопротейдів) є одним із основних патогенетичних шляхів пошкодження тканин і органів при травматичному і ішемічному ураженні. Підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) є також механізмом розвитку різних сигнальних метаболічних ланок. Темпи перебігу вільнорадикальних процесів та їх регуляція перебувають під контролем багатокомпонентної системи антиоксидантного захисту. Основним проявом окиснювального стресу та параметром оцінки рівня патобіохімічних змін є накопичення первинних і вторинних продуктів вільно-радикального окислення.

Найбільш інформативними показниками рівня окисного стресу є утворення дієнових кон'югатів (ДК) із окиснених поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), а також МДА.

Малоновий діальдегід виникає в тканинах при деградації поліненасичених жирів на тлі ушкодження активними формами кисню (АФК), служить маркером ПОЛ і окиснювального стресу та визначається не лише в тканинах, але і в плазмі крові, тобто є показником системних розладів.

В умовах окисного стресу відбувається окислювальна модифікація білків (ОМБ). Вільні радикали ушкоджують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи первинну, вторинну і третинну структуру білків, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули, тобто втрати її функціонального призначення. Це має відношення не лише до структурних білків мембран та цитоплазми, але і білків позаклітинного матриксу, факторів росту, білків мікросудин. Особливо легко окиснюються білки, що містять у своєму поліпептидному ланцюгу амінокислоти з SH-групами. Значна кількість ферментів містить такі групи у своїх активних центрах.

Характерним маркером пошкодження білків за умов окиснювального стресу є утворення карбонільних груп при окисленні амінокислот: лізину, аргініну і проліну. Карбоксильні групи білків під дією АФК перетворюються в карбонільні групи, які, в свою чергу, можуть взаємодіяти з аміногрупами, що в остаточному підсумку призводять до утворення поперечних зшивок між білковими молекулами і порушення їх активності.

У проведених експериментальних дослідженнях було встановлено, що через 1 місяць після ушкодження сідничого нерва та його аутопластики відбувається розвиток ПОЛ та деградація білків у дистальному сегменті нерва, що є результатом травматичного, ішемічного та метаболічного ушкодження. Основними показниками цих розладів є: 1) утворення ТБК-активних продуктів (продукти ПОЛ, що взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою), основним компонентом яких є МДА; 2) утворення ДК; 3) поява карбонільних груп в ушкоджених протеїнах; 4) ушкодження та зменшення рівня метаболічно активних

вільних низькомолекулярних SH-груп, основним компонентом яких є глутатіон. Глутатіон є низькомолекулярним антиоксидантом і може брати участь у неферментативному антиоксидантному захисті, виступаючи ефективним акцептором вільних радикалів. Зниження рівня глутатіону викликає зростання рівня АФК, піддає клітку ризику окисного пошкодження. Разом з тим надлишкова продукція глутатіону є індикатором розвитку окисного стресу, що згодом приводить до клітинної загибелі.

Після аутопластики нерва рівень ТБК-активних продуктів збільшився у 2,7 разів ($p < 0,05$), ДК – у 3 рази ($p < 0,05$), карбонільних груп – у 2,7 разів ($p < 0,05$), а вміст вільних низькомолекулярних SH-груп був меншим щодо контрольного показника – у 3,8 разів ($p < 0,05$). Отримані дані вказують на розвиток прогресуючого окиснювального стресу та ушкодження білкових і ліпідних компонентів клітинних структур ушкодженого нерва (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Метаболічні зміни окисно-відновного профілю у дистальному фрагменті сідничого нерва після аутопластики дефекту нерва

Група	Рівень продуктів перекисного окиснення			Вільні низькомолекулярні SH-групи, нмоль/мг протеїну
	ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг протеїну	ДК, нмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	
Контроль (Група 1)	0,86±0,06	1,06±0,04	0,82±0,04	16,84±0,46
Пластика (Група 2)	2,34±0,10 a	3,25±0,06 a	2,28±0,05 a	4,45±0,25 a
ТЖТ (Група 3)	1,13±0,07 a,b	2,16±0,10 a,b	1,54±0,09 a,b	8,69±0,25 a,b
ТКМ (Група 4)	1,97±0,04 a,b,c	2,35±0,04 a,b	1,80±0,09 a,b	7,02±0,38 a,b,c

Комплекс (Група 5)	1,44±0,07 a,b,c,d	2,20±0,09 a,b	1,65±0,08 a,b	11,86±0,45 a,b,c,d
-----------------------	----------------------	------------------	------------------	-----------------------

Примітка: а – достовірно до контролю ($p < 0,05$); б – достовірно до травми ($p < 0,05$); с – достовірно до ТЖТ ($p < 0,05$); д – достовірно до ТКМ ($p < 0,05$)

При трансплантації жирової тканини і кісткового мозку встановлено позитивний вплив застосованих засобів. Так, рівень ТБК-активних продуктів зменшився у 2 і 1,2 рази ($p < 0,05$), ДК – у 1,5 і 1,4 рази ($p < 0,05$), карбонільних груп – у 2,4 і 1,2 рази ($p < 0,05$). Разом з тим вміст вільних низькомолекулярних SH-груп достовірно збільшився у 1,9 і 1,6 разів. Тобто за всіма параметрами оцінки окисного стресу ТЖТ була більш виражений вплив на патологічні окисні процеси в ушкодженному нерві. При цьому комбіноване застосування цих засобів позитивно вплинуло на рівень утворення/відновлення вільних низькомолекулярних SH-груп (на 36,3% щодо ТЖТ і на 68,9% щодо ТКМ, $p < 0,05$), що вказує на активацію ендogenous антиоксидантних метаболічних шляхів після аутопластики.

Глутатіон присутній в клітинах головним чином у відновленій формі, тоді як кількість окисненого продукту не перевищує 1% від його загального внутрішньоклітинного вмісту. Понад 85% глутатіону знаходиться в цитоплазмі, але деяка його частина після синтезу в цитоплазмі виявляється в мітохондріях, ядрі та інших органелах. Серед функцій, які виконує глутатіон, в першу чергу слід відзначити його участь у захисті клітин від продуктів окисного стресу. Так, глутатіон пероксидаза (GPx; номенклатура ферментів: EC 1.11.1.9) за участі глутатіону відновлює перекис водню до води, відновлює органічні продукти гідропероксидації до відповідних спиртів.

Активація глутатіонзалежної антиоксидантної ферментної системи нейтралізує реакції ПОЛ і підтримує у відновленому стані SH-групи протеїнів, забезпечуючи цим їх функціональну активність. GPx – один з основних ферментів цієї системи, яка каталізує відновлення пероксиду водню та інших органічних

гідропероксидів до води і спиртів з одночасним окисненням відновленого глутатіону. Субстратом GPx є пероксид водню.

В нашому дослідженні активність GPx після травми та аутопластики зменшилася у 1,5 разів ($p < 0,05$), що вказує на порушення цієї системи, тобто зменшення вмісту ферменту або його власна пероксидація під дією АФК та втрати активності (табл. 2.3). При застосуванні ТЖТ і ТКМ встановлено компенсаторну активацію GPx: активність ферменту зросла у 2,8 і 1,7 разів ($p < 0,05$).

Іншим важливим ферментом відновлення антиоксидантної системи є глутатіон редуктаза (GR; номенклатура ферментів: EC 1.8.1.7) – фермент, який відновлює дисульфідний зв'язок окисненого глутатіону GSSG до його сульфгідрильної (метаболічно активної) форми GSH. Рівень активності GR у групі кролів після травми достовірно був меншим контрольних значень майже у 2 рази ($p < 0,05$), що пояснює причину низького рівня відновленого глутатіону. Разом з тим за умов ТЖТ активність GR достовірно збільшилась у 2,8 разів ($p < 0,05$), а після ТКМ – у 2,1 рази ($p < 0,05$).

Таблиця 2.3

Зміни активності ферментативних систем дистального фрагмента сідничого нерва після аутопластики дефекту нерва

Група	Рівень білка, мг/мл	Активність ферментів антиоксидантного профілю, нмоль/мг протеїну			Активність ензиму DT-діафрази, нмоль/мг/хв
		Каталаза	GPx	GR	
Контроль (Група 1)	1,99±0,09	14,66±0,31	1,06±0,03	2,13±0,03	2,40±0,04
Пластика (Група 2)	3,77±0,38 a	30,33±2,79 a	0,70±0,16 a	1,07±0,06 a	0,54±0,02 a
ТЖТ (Група 3)	2,98±0,22 a,b	18,65±1,82 a,b	2,00±0,36 a,b	3,07±0,59 b	0,67±0,03 a,b

ТКМ (Група 4)	3,03±0,33 a,b	22,38±1,13 a,b	1,24±0,03 a,b,c	2,33±0,02 b	1,77±0,04 a,b,c
Комплекс (Група 5)	2,88±0,46 a,b	22,84±1,75 a,b	1,45±0,06 a,b,e	2,27±0,14 b	1,94±0,23 b,c

Примітка: a – достовірно до контролю ($p < 0,05$); b – достовірно до травми ($p < 0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p < 0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p < 0,05$)

Іншим ферментом антиоксидантного профілю дії є каталаза (номенклатура ферментів: ЕС 1.11.1.6). Специфічність каталази відносно до субстрату-відновників невелика, тому вона може каталізувати не тільки розкладання перекису водню, але і окислення нижчих спиртів. Функція каталази зводиться до руйнування токсичного пероксиду водню, що утворюється в ході різних окислювальних процесів в тканинах. У проведених дослідженнях встановлено компенсаторну активацію каталази після аутопластики у 2 рази ($p < 0,05$), що все ж таки вказує на наявність порушених, але мінімально функціонуючих ендогенних цитопротекторний механізмів у ушкодженому сідничому нерві. Незважаючи на це після ТЖТ і ТКМ встановлено зменшення активності каталази у 1,6 і 1,3 рази ($p < 0,05$). Така тенденцію на нашу думку є показником зменшення продукції перекису водню і, як наслідок, зменшення продукування самого ензиму, тобто відбувається репаративне відновлення ушкодженого нерва.

Синтез глутатіону *de novo* та його відновлення реалізується за АТФ-залежним шляхом, тобто порушення мітохондріальної функції корелює із зниження відновленого глутатіону. Враховуючи це важливим було оцінити рівень метаболічних розладів мітохондрій. Одним із таких показників є активність DT-діафрази (NAD(P)H-хіноноксидоредуктази; номенклатура ферментів: ЕС 1.6.99.2) – ензим, синтез якого активується при оксидативному стресі і який бере участь, принаймні, в трьох системах біохімічних реакцій: 1 – відновленні хінонів, 2 – підтримання ендогенних антиоксидантів у відновленій активній формі і 3 – регуляція стабільності пухлинного супресора – протеїну p53. Крім того, DT-діафроза координовано стимулюється з іншими ензимами детоксикації, такими

як глутатіон-S-трансфераза. Відновлені хінони залучені в якості коферментів оксидоредуктаз мітохондрій.

Активність DT-діафрази після травми була достовірно меншою щодо контрольного показника у 4,4 рази ($p < 0,05$), при ТЖТ і ТКМ достовірно зросла у 1,2 і 3,3 рази ($p < 0,05$), а при їх комбінації збільшилася у 3,6 разів ($p < 0,05$) і досягла рівня контрольної групи 1, тобто відбувала виражена активація DT-діафрази під дією введення клітин червоного кісткового мозку.

Застосування ТЖТ підвищувало вплив ТКМ і позитивно вплинуло на рівень продукції ДК ($p < 0,05$), відновлення вільних низькомолекулярних SH-груп ($p < 0,05$) і активність DT-діафрази ($p < 0,05$).

Висновки до розділу 2.2. Узагальнюючи отримані результати, можна зробити висновок, що значна роль у системі антиоксидантного захисту ушкодженого нерва належить глутатіону, ферментам, що залучені до його синтезу і відновлення, ферментів прямої детоксикації і ферментів, які реалізують енергообмін, або відновлюють ензими та кофактори, що залучені в цей процес. Відновлену глутатіону є важливим внутрішньоклітинним антиоксидантним механізмом захисту відіграє особливу роль у підтримці клітинного редокс-статусу та забезпечує регуляцію цілого ряду функцій клітини, в тому числі регуляцію генної експресії і регуляції клітинного циклу (мітозу, апоптозу). Зниження рівня ферментативних та не ферментативних систем детоксикації є індикатором порушення клітинного енергообміну, гіпоксії та інших метаболічних дисфункцій. Незважаючи на це застосування ТЖТ забезпечує нейтралізацію реакцій ПОЛ, пригнічує утворення продуктів пероксидації, позитивно впливає на рівень утворення глутатіону. Застосування ТКМ забезпечило схожий ефект, проте в більшій мірі вплинуло на активність DT-діафрази.

Публікації в яких наведено результати досліджень розділу 2:

1. Гайович І.В. Вплив суспензії жирової тканини на відновлення периферійного нерва після аутопластики дефекту / Гайович І.В., Страфун

С.С., Гайович В.В., Борзих Н.О., Савосько С.І. // Вісник ортопедії, травматології та протезування. - 2015. - №4. - С. 46-50.

2. Гайович І.В. Вплив трансплантації концентрованої суспензії червоного кісткового мозку на структурно-функціональне відновлення сідничного нерва після аутопластики / Гайович І.В., Страфун С.С., Гайович В.В., Борзих Н.О., Савосько С.І. // Літопис травматології та ортопедії. - 2016. - №1-2. - С. 96-102.
3. Гайович І.В. Застосування жироплазмотромбоцитарної тканинної суміші у регенерації травматично ушкодженого периферійного нерва / Гайович І.В., Борзих Н.О. // Травма. - 2016 - №2 (17). - С. 73-77.
4. Гайович І.В. Нейрометаболичні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва / Гайович І.В., Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. // Вісник морської медицини. - 2018. - №1 (78). - С. 74-84.

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНОГО ПЕРІОДУ ТРИВАЛО ДЕНЕРВОВАНИХ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ТА ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ ЇХ МЕТАБОЛІЧНОЇ ПІДТРИМКИ

3.1. Результати досліджень впливу трансплантації жирової тканини і кісткового мозку на атрофічні зміни скелетних м'язів

Аналіз змін біохімічних маркерів оксидативного стресу засвідчив суттєві зміни метаболічних процесів у сідничому нерві після травматичного ушкодження. Рівень регенеративних (репаративних) процесів травмованого нерву впливає і ймовірно визначає темпи дистрофічних і атрофічних змін денервованого м'язу. Регенерація травматично ушкодженого нерва крізь трансплантат є досить ускладненою в зв'язку з формуванням гліального та сполучнотканинного рубця у місці шва фрагментів нерва і відповідно різний рівень проростання нервових волокон в дистальному сегменті нерва. Враховуючи це важливим є дослідження не лише структурних і фізіологічних змін тривало денервованого м'язу, але і метаболічного статусу органу. Дослідження патогенетичних ланок дисметаболічних розладів м'язів дасть можливість вплинути на темпи їх атрофії та відновлення.

Зміни рівня продукції біохімічних маркерів оксидативного стресу засвідчив різні темпи дисметаболічних розладів на тлі регенерації хірургічно відновленого сідничого нерва. Так, концентрація ТБК-активних продуктів, головним чином малонового діальдегіду (продукту ПОЛ) в м'язах на рівні стегна була більше контрольних значень у 1,9 разів, а на рівні гомілки в 3,1 рази ($p < 0,05$) (табл. 3.1). Рівень продукції дієнових кон'югатів, тобто окиснених жирних кислот, також зростав у дистальних м'язах щодо місця ауопластики сідничого нерва. На рівні стегна концентрація дієнових кон'югатів була більшою в середньому у 2 рази, а на рівні гомілки у 2,5 рази ($p < 0,05$). Ступінь окиснення білкових молекул за

показником концентрації карбонільних груп зріс у 2 і 3,1 разів ($p < 0,05$). Разом з тим рівень вільних низькомолекулярних пептидних носіїв SH-груп в м'язах гомілки був достовірно меншим порівняно до м'язів стегна на 64,7%, а порівняно до контрольного показника у 1,7 і 2,8 разів ($p < 0,05$) відповідно.

Отримані результати засвідчили прогресуючі метаболічні розлади скелетних м'язів гомілки в порівнянні з м'язами на рівні аутопластики. Результати біохімічних показників можуть свідчити про часткове відновлення денервованих м'язів при взаємодії з регенеруючим нервом. Формування нових нейрон-м'язових ймовірно активувало синтетичні процеси, в тому числі на рівні ферментативних антиоксидантних механізмів, що позитивно вплинуло на регрес рівня пероксидації білкових і ліпідних молекул, тобто запобігання атрофії і активація репарації м'язових волокон.

Аналіз змін рівня загального білка в гомогенатах м'язів засвідчив атрофічні процеси на рівні гомілки: вміст протеїнів був достовірно меншим контрольних значень на 12,2% ($p < 0,05$) (табл. 3.2). Разом з цим встановлено компенсаторну активацію ензимів системи антиоксидантів. Активність каталази на рівні стегна збільшилась у 1,8 разів ($p < 0,05$), а глутатіон пероксидази і глутатіон редуктаза в середньому у 1,6 разів ($p < 0,05$). У м'язах гомілки встановлено активацію лише каталази в 2,5 разів щодо контрольного показника ($p < 0,05$). При цьому активність DT-діафори в обох випадках достовірно зменшилась в 2 і 3,5 разів, що також є проявом дистрофічних змін органу ($p < 0,05$).

Узагальнюючи отримані дані можна зробити висновок про те, що у тривало денервованих скелетних м'язах відбувається порушення рівня і напрямку окисно-відновних реакцій, що спричинює окиснення біологічних мембран клітин і протеїнів (не лише структурних, але і ензимів) на тлі продукування перекису водню, вільних радикалів та їх цитотоксичних похідних. На нашу думку метаболічні розлади лежать в основі вторинних дистрофічних змін скелетних м'язів, що встановлено на рівні м'язів гомілки. При цьому регенерація ушкодженого нерва активувала репаративні процеси у м'язах на рівні

проростання нервових волокон, в основному на рівні неврони, що позитивно вплинуло на темпи їх атрофії і дистрофії.

У групі тварин 3, яким наносили жирову тканину навколо сідничого нерва на рівні пластики встановлено позитивну динаміку відновлення метаболічного статусу тривало денервованого м'язу. У м'язах кінцівки на рівні місця пластики рівень утворення ТБК-активних продуктів зменшився на 29,8%, концентрація дієнових кон'югатів на 34,4%, а концентрація карбонільних груп на 15,4% ($p < 0,05$). На рівні дистальних м'язів, тобто гомілки, відповідні показники зменшилися відповідно на 46,7%, 33,1% і 34,9%, тобто суттєво менше. При цьому встановлено збільшення рівня низькомолекулярних SH-вмісних антиоксидантів на 34,0% у м'язах стегна і 61,3% у м'язах гомілки, що головним чином реалізується за механізмів активації їх синтезу та відновлення окиснених продуктів пероксидації (за участі GPx і GR).

Ферментативні системи детоксикації продуктів ПОЛ (каталаза, GPx і GR) відновилися до рівня контрольних показників на рівні аутопластики ($p < 0,05$), а на рівні гомілки відмічено ознаки компенсаторної активації цих ензимів, що можна розглядати в якості активації захисного механізму в м'язах щодо попередження розвитку оксидативного стресу і вторинних метаболічних розладів з метою підтримки м'язів на етапі репаративної регенерації сідничого нерва, тобто до реіннервації м'язів.

В дистальних м'язах щодо рівня аутопластики активність DT-діафрази не досягала контрольного рівня, але була більше порівняно групи 2 без корекції майже в 2,6 разів ($p < 0,05$). Про позитивний вплив ТЖТ вказує також незмінений рівень загального білка в гомогенатах досліджуваних м'язів. Одним із можливих механізмів протекторного впливу ТЖТ є паракринна регуляція оточуючих тканин кінцівки, а також пряма детоксикація ПНЖК диспергованої жирової тканини, що зменшує концентрацію вільних радикалів шляхом їх прямої нейтралізації і відповідно здійснює опосередкований цитопротекторний ефект.

Таблиця 3.1

Метаболічні зміни скелетних м'язів на тлі аутопластики сідничого нерва

Група	Рівень продуктів перекисного окиснення			Вільні низькомолекулярні SH-групи, нмоль/мг протеїну	
	ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг протеїну	ДК, нмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну		
М'язи стегна в місці невроми					
Контроль (Група 1)	0,74±0,03	1,73±0,07	1,85±0,04	13,27±0,28	
Пластика (Група 2)	1,41±0,06а	3,51±0,06а	3,77±0,04а	7,48±0,21а	
ТЖТ (Група 3)	0,99±0,03а,б	2,30±0,06а,б	3,19±0,12а,б	10,03±0,11а,б	
ТКМ (Група 4)	1,23±0,03а,б,с	2,63±0,03а,б,с	2,56±0,09а,б,с	10,34±0,17а,б	
Комплекс (Група 5)	1,23±0,05а,б,с	2,21±0,04а,б	2,92±0,05а,б	10,63±0,34а,б,с	
М'язи гомілки					
Контроль (Група 1)	0,73±0,04	1,86±0,04	1,86±0,07	13,48±0,34	
Пластика (Група 2)	2,31±0,12а	4,71±0,18а	5,81±0,14а	4,65±0,36а	
ТЖТ (Група 3)	1,23±0,04а,б	3,15±0,13а,б	3,78±0,30а,б	7,5±0,31а,б	
ТКМ (Група 4)	1,80±0,09а,б,с	3,75±0,11а,б,с	4,31±0,20а,б	6,38±0,23а,б,с	
Комплекс (Група 5)	1,74±0,10а,б,с	3,76±0,15а,б,с	3,73±0,20а,б	6,36±0,25а,б,с	

Примітка: а – достовірно до контролю (p<0,05); б – достовірно до травми (p<0,05); с – достовірно до ТЖТ (p<0,05);

d – достовірно до ТКМ (p<0,05)

Таблиця 3.2

Зміни активності ферментативних систем скелетних м'язів на тлі аутопластики сідничного нерва

Група	Рівень білка, мг/мл	Активність ферментів антиоксидантного профілю			Активність ензиму DT-діафрази, нмоль/мг/хв
		Каталаза, нмоль/мг протеїну	GRx, нмоль/мг протеїну	GR, нмоль/мг протеїну	
М'язи стегна в місці невроми					
Контроль (Група 1)	7,31±0,41	4,03±0,12	1,35±0,05	1,32±0,03	0,85±0,02
Пластика (Група 2)	7,12±0,18	7,28±0,62a	2,22±0,07a	2,12±0,07a	0,41±0,08a
ТЖТ (Група 3)	7,94±0,16b	4,04±0,29b	1,40±0,05b	1,42±0,01a,b	0,80±0,07b
ТКМ (Група 4)	7,30±0,40	5,96±1,99	0,95±0,04a,b,c	1,05±0,02a,b,c	0,97±0,07b
Комплекс (Група 5)	7,16±0,31	4,54±0,06a,b	1,42±0,02b,c,d	1,67±0,01a,b,c,d	0,82±0,06b
М'язи гомілки					
Контроль (Група 1)	6,87±0,37	4,07±0,18	1,40±0,05	1,36±0,04	0,87±0,04
Пластика (Група 2)	6,03±0,17a	10,34±0,40a	1,39±0,02	1,42±0,01	0,25±0,02a
ТЖТ (Група 3)	7,26±0,45b	12,15±0,31a,b	1,99±0,07a,b	2,19±0,04a,b	0,67±0,03b
ТКМ (Група 4)	6,36±0,14	9,74±0,03a,c	1,35±0,06c	1,40±0,01c	1,03±0,04b,c
Комплекс (Група 5)	6,76±0,09b,d	8,70±0,29a,b,c,d	1,55±0,08b,c,d	1,56±0,05b,c,d	1,00±0,03b,c

Примітка: а – достовірно до контролю (p<0,05); b – достовірно до травми (p<0,05); c – достовірно до ТЖТ (p<0,05);

d – достовірно до контролю

до

ТКМ

(p<0,05)

Аналіз змін концентрації маркерів окиснювального стресу у скелетних м'язах кінцівки після аутопластики великого дефекту сідничого нерва та введення ТКМ в групі 4 засвідчив певні різницю впливу запропонованого способу корекції метаболічних розладів щодо ТЖТ в групі 3. За загальним рівнем білка в зразках відмічено лише тенденцію щодо попередження гіпотрофічних змін м'язів, достовірної різниці на рівні стегна та гомілки із групою 3 без ТКМ не встановлено. Рівень генерації продуктів ПОЛ зменшувався під впливом ТКМ: концентрація дієнових кон'югатів була меншою на 25,1% і 20,3% ($p < 0,05$) залежно від рівня скелетного м'язу щодо аутопластики, концентрація ТБК-активних продуктів зменшилася – на 12,7% і 22,1% ($p < 0,05$), а карбонільних груп – на 32,1% і 25,8% ($p < 0,05$) відповідно. Проте в загальному вимірі цих даних рівень утворення зазначених продуктів дисметаболічних реакцій при ТЖК був меншим за виключенням ступеню утворення карбонільних груп в м'язових білках.

Концентрація низькомолекулярних пептидних SH-груп в м'язах гомілки достовірно зменшився на 38,2% і 37,2% ($p < 0,05$). При цьому ступінь нейтралізації ендogenous антиоксиданту у м'язах гомілки був суттєво вищим порівняно до м'язів стегна (в середньому на 38,3%). В порівнянні із впливом ТЖТ на рівень утворення низькомолекулярних пептидних SH-груп, останній мав достовірно більший вплив на рівні м'язів гомілки (на 14,9%).

Система ензиматичного антиоксидантного захисту під впливом ТКМ характеризувалася неоднозначними змінами відновлення цитопротекторний механізмів детоксикації продуктів ПОЛ. Так, на рівні м'язів стегна активність глутатіон пероксидази і глутатіон редуктаза була меншою як до групи без ТКМ, так і до групи 2 контролю, а активність каталази лише наближалась до контрольних показників. На рівні м'язів гомілки достовірної різниці щодо групи 2 без ТКМ не встановлено. Отримані дані можуть вказувати на прояви виснаження досліджуваної системи детоксикації. У відповідь на ці явища в м'язах гомілки зареєстровано компенсаторне збільшення активності DT-діафрази (майже в 4,1 разів, а в м'язах стегна відновлення до контрольних значень). Тобто, вплив ТКМ

позитивно впливає на короткотермінову генерацію реакцій та відповідних продуктів оксидативного стресу, що вичерпує ендогенний пул цитопротекторний антиоксидантів і зареєстровано нами у вигляді зменшення концентрації окиснених продуктів білків і жирних кислот. Незважаючи на це потенціалу трансплантованих бластних клітин не вистачає для тривалої підтримки достатнього рівня ферментативних систем детоксикації, що завершується їх виснаженням.

Порівняльний аналіз впливу комбінованої трансплантації і ізольованої ТЖТ і ТКМ не показав суттєвої різниці між цими групами порівняння. Сумарний позитивний вплив відмічено лише на показнику активності каталази, дієнових кон'югатів, низькомолекулярних пептидних SH-груп. Зміна інших показників була в межах статистичної похибки груп.

Висновки до розділу 3.1. Узагальнюючи отримані результати експериментів можна стверджувати, що ТЖТ і ТКМ попереджає розвиток оксидативного стресу в денервованих м'язах, метаболічно підтримує м'яз до реіннервації, активує компенсаторні механізми цитопротекції і супутньої репарації тканин. В порівняльному плані ТЖТ є потенційно більш перспективною технологією, що може бути застосована з метою підтримки скелетного м'язу при розвитку травматичної хвороби периферійного нерва.

3.2. Гістологічні зміни м'язів гомілки при травмуванні та пластиці сідничого нерва

Результати біохімічних досліджень дозволили встановити метаболічні показники, що активуються та супроводжують термін денервації скелетного м'язу. Аналіз біохімічних показників засвідчив розвиток оксидативного стресу та порушення системи антиоксидантного захисту, що проявлялося у зменшенні активності ферментів антиоксидантної системи. На нашу думку виражені метаболічні розлади тривало денервованого м'язу є чинником прогресуючого гіпотрофічного процесу та можуть пояснити низьку ефективність функціонального відновлення при аутопластиці нерва.

Іншим важливим результатом дослідження стало виявлення часткового відновлення метаболічного профілю м'язової тканини при аутопластиці ушкодженого нерва. При цьому повного відновлення не відмічено, що пояснюється лише частковою регенерацією ушкодженого нерва крізь сегмент пластики.

Разом з тим, трансплантація червоного кісткового мозку та жирової тканини позитивно вплинуло на регенеративні процеси хірургічно відновленого нерва та метаболічних процесів нерва і м'язу на стадії реіннервації. При цьому рівень відновлення метаболічного профілю при застосуванні різних клітинних суспензій (гелю) відновлювався у різній мірі: кістковий мозок активував ферментативні системи антиоксидантного захисту, а трансплантація жирової тканини – в більшій мірі пригнічувала реакції пероксидації.

Зважаючи на ці результати важливим є оцінити структурні зміни ефекторних м'язів для виявлення доцільності застосування моно- та комбінованої клітинної суспензії з метою підтримки денервованого м'язу та пригнічення гіпотрофічного процесу.

Для достовірної оцінки затримки гіпотрофічного процесу було оцінено гістологічну структуру м'язів на морфометричний аналіз структурних компонентів міонів м'язу на рівні гомілки контрольної та дослідних груп.

При аналізі гістологічних препаратів контрольної групи 1 було виявлено неушкоджену структуру скелетного м'язу. М'язова тканина представлена пучками поперечно посмугованих м'язових волокон, групи яких оточені тонким прошарком сполучної тканини (ендомізієм) (рис. 3.1). М'язові волокна на поперечному розрізі округлої форми, гомогенно профарбовані. Між групами міонів локалізовані кровоносні мікросудини, поодинокі групи нервових осьових циліндрів. Групи міонів з магістральними судинами (артеріолами і венулами) оточені перимізієм і формують м'яз як орган.

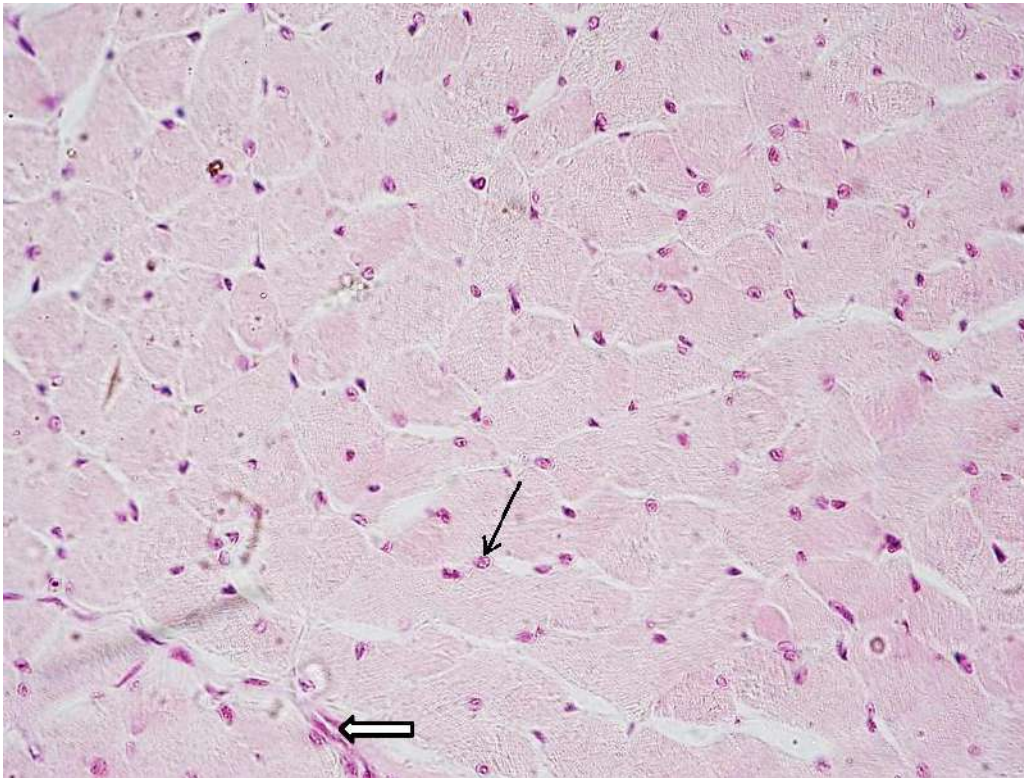


Рис. 3.1 Скелетний м'яз гомілки контрольної групи 1. Щільно організовані неушкоджені м'язові волокна, без ознак запального, атрофічного та проліферативного процесу. Примітка: \longleftrightarrow перимізій; \leftarrow міоядра. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10

Атрофічних м'язових волокон, волокон в стані некрозу та фібротичних змін м'язу не виявлено. Описані морфологічні особливості м'язової тканини були оцінені як контрольні.

У дослідній групі 2 тварин, яким було нанесено травму сідничого нерва та його аутопластики, встановлено гетерогенні гіпотрофічні зміни м'язів гомілки. Ступінь вираженості гіпотрофічних змін м'язової тканини коливається від незначної до різко вираженою. У більшості зразків фрагментів м'язу дистрофічний процес на гістологічному рівні характеризувався зменшенням діаметру м'язових волокон, атрофією волокон, втратою міоядер. Виявлено втрату поперечної посмугованості м'язових волокон, що свідчить про порушення скоротливих міофібрил. Виявлено втрату поодиноких або окремих груп м'язових волокон (рис. 3.2). В інших зразках виявлено гіперплазію міоядер за відсутності

фібробластичних реакцій та лейкоцитарного інфільтрату (рис. 3.3). В усіх досліджуваних фрагментах реєстрували порушення стромальної організації м'язів, розпушення міонів. Магістральні судин епі- та перимізію характеризувалися еритроцитарних стазом та тромбозом, що може свідчити про порушення тону судин та перфузії м'язу.

Морфометричний аналіз дозволив кількісно оцінити рівень гіпотрофії м'язової тканини на рівні гомілки. Так, товщина м'язових волокон, площа їх поперечного перерізу зменшився в середньому у 2,7 разів ($p < 0,01$) (табл. 3.3). При цьому достовірно збільшилась кількість міоядер в сімпластах – в середньому на 35,1% ($p < 0,01$). Площа активованих міоядер збільшилась на 37,4% ($p = 0,03$). Морфометричний аналіз підтверджує твердження про одночасний розвиток двох незалежних процесів: виражений розвиток гіпотрофії м'язової тканини і регенеративна активація тривало денервованих міонів м'язу. Таку морфологічну картину можна пояснити тим, що після аутопластики сідничого нерва відбувається лише часткова регенерація осьових циліндрів по збереженим фасцикулам.

У групі 3, яким наносили клітинну суспензію жирової тканини, встановлено суттєву відміну порівняно до групи 2- лише аутопластики. Загальна структурна організація м'язу залишалась збереженою, реєструвалися групи міонів, що розмежовані перимізієм (рис. 3.4). Стромальні компоненти м'язу частково порушені, колагенові волокна розшаровані. Відмічено втрату поперечної посмугованості, суть якої полягає в деструкції міофібрил. При цьому ділянки уражених м'язів характеризується зміненим рівнем профарбованості. Більшість м'язових волокон витончені, зменшений їх діаметр. Частина ядер м'язових волокон з ознаками вакуолізації або пікнозу, гіперплазії міоядер не виявлено. Разом з тим, дифузної втрати м'язових волокон, як це спостерігали у попередній групі 2, не виявлено. Ознак фіброзного або запального процесу не виявлено. В загальному підсумку рівень гіпотрофічного процесу був суттєво менш вираженим, ніж без застосування суспензії жирової тканини.

Таблиця 3.3

Морфометричні зміни скелетних м'язів гомілки при аутопластиці сідничого нерва через 1 місяць після пластики

Група	Морфометричний показник		
	Площа поперечного перерізу м'язових волокон, мкм ²	Кількість ядер на м'язове волокно	Площа ядер м'язових волокон, мкм ²
Контроль (Група 1)	1484,9±150,8	2,93±0,27	25,4±2,15
Пластика (Група 2)	539,4±37,3 P ₁₋₂ <0,001	3,96±0,35 P ₁₋₂ <0,001	34,9±5,17 P ₁₋₂ =0,03
ТЖТ (Група 3)	638,5±59,9 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ =0,13	3,60±0,33 P ₁₋₃ =0,002 P ₂₋₃ =0,09	41,3±4,70 P ₁₋₃ =0,03 P ₂₋₃ =0,07
ТКМ (Група 4)	559,6±62,0 P ₁₋₄ <0,001 P ₂₋₄ =0,40	4,48±0,37 P ₁₋₄ <0,001 P ₂₋₄ =0,02	43,6±5,19 P ₁₋₄ <0,001 P ₂₋₄ =0,07
Комплекс (Група 5)	966,8±108,8 P ₁₋₅ =0,001 P ₂₋₅ =0,004 P ₃₋₅ =0,002 P ₄₋₅ =0,001	5,57±0,62 P ₁₋₅ =0,006 P ₂₋₅ =0,001 P ₃₋₅ =0,001 P ₄₋₅ =0,01	50,1±3,50 P ₁₋₅ =0,001 P ₂₋₅ =0,004 P ₃₋₅ =0,003 P ₄₋₅ =0,12

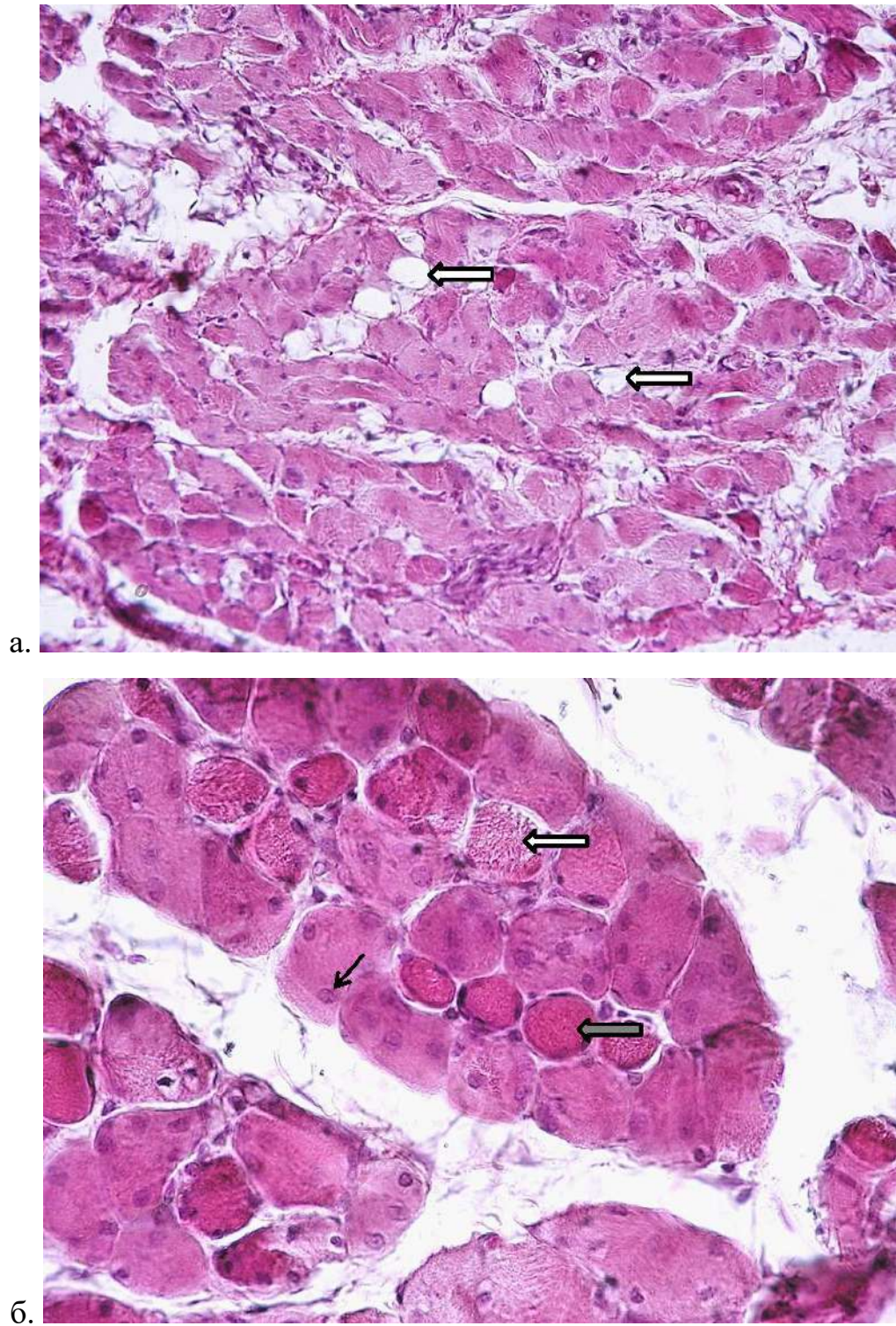


Рис. 3.2 Гіпотрофічні зміни скелетного м'язу, некроз м'язових волокон, порушення гістологічної організації м'язової тканини (група 2). Примітка: \leftarrow некроз, набряк м'язового волокна; \leftarrow коагуляція, атрофія м'язового волокна; \leftarrow міоядра. Гематоксилін-еозин. а: Об. 20, ок. 10; б: Об. 40, ок. 10

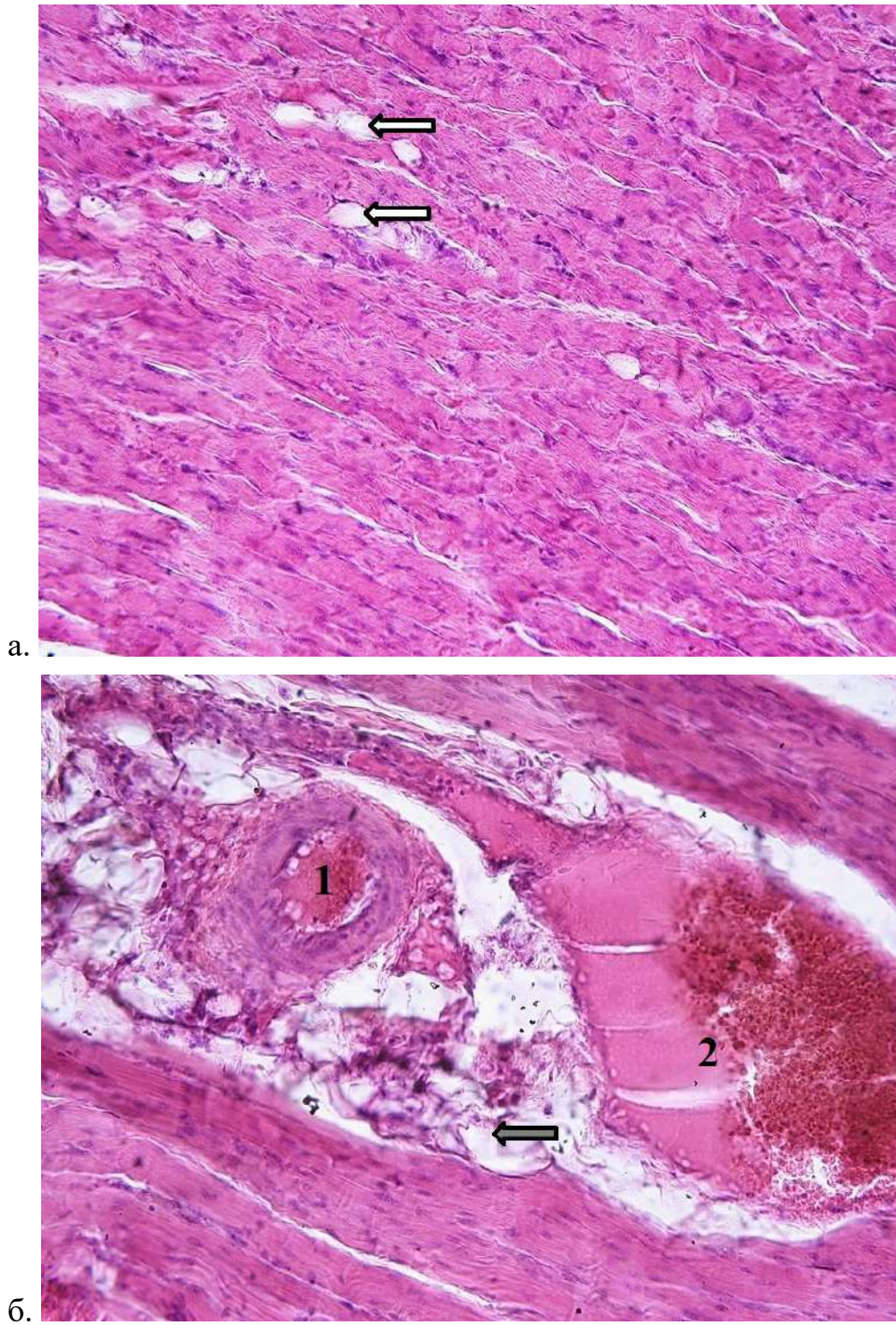




Рис. 3.3 Структурні зміни скелетного м'язу після аутопластики сідничого нерва (група 2). Збільшення щільності міо ядер, порушення організації ендо- та перимізію. Примітка:  некроз м'язового волокна;  розволокнення стромі; 1 – стаз артерії; 2 – тромбоз вени. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10

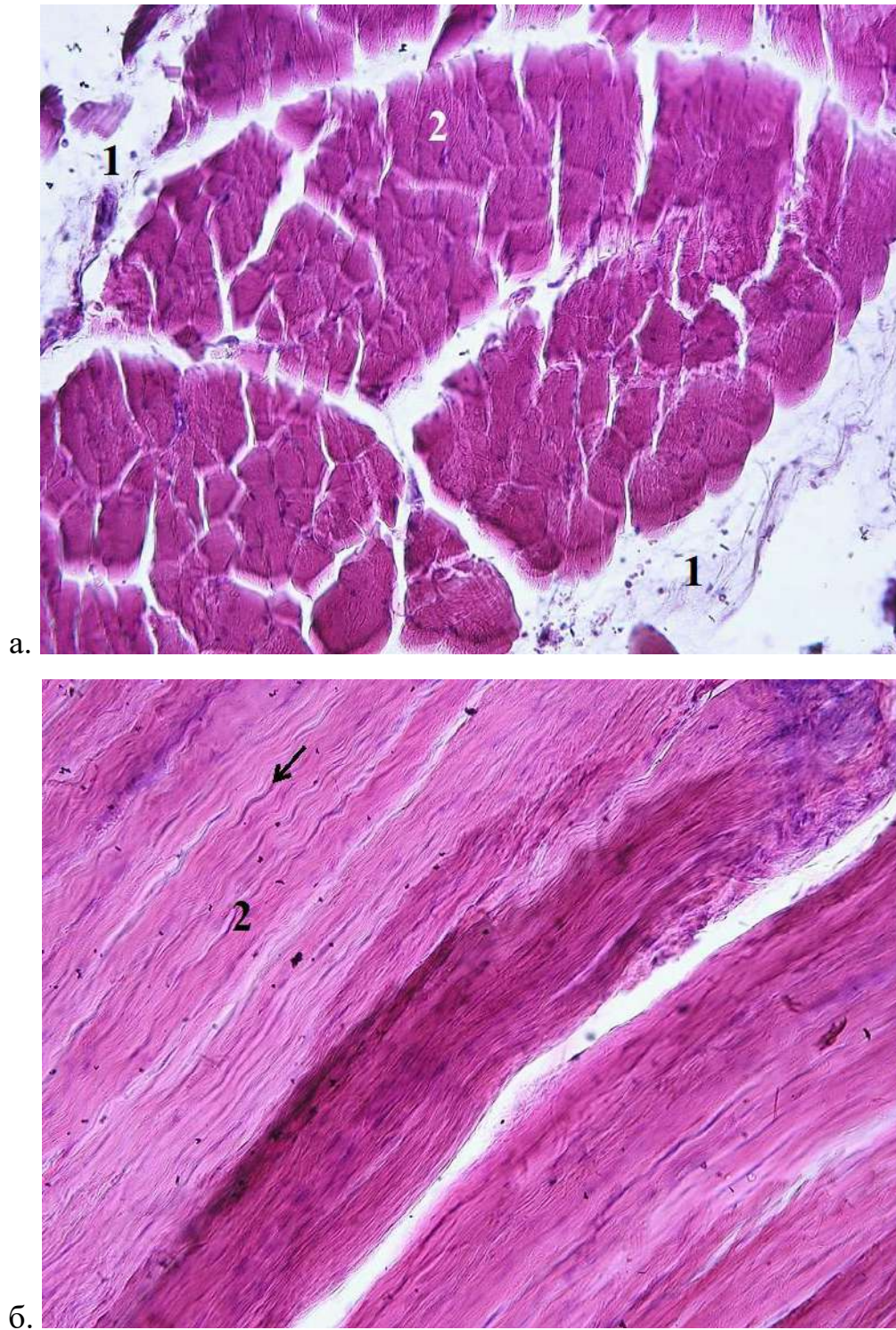


Рис. 3.4 Гіпотрофічні зміни скелетного м'язу після аутопластики сідничого нерва та трансплантації жирової тканини (група 3). Регрес кількості міо ядер, гіпотрофічні зміни м'язових волокон. Примітка: 1 – розволокнення перимізію; 2 – міони з порушеною посмугованістю; ← міо ядра. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10

При трансплантації суспензії жирової тканини в групі 3 морфометричний аналіз засвідчив позитивний вплив запропонованого способу підтримки тривало денервованого м'язу.

Морфометричний аналіз дозволив кількісно оцінити рівень гіпотрофії м'язової тканини на рівні гомілки. На 18,3% ($p < 0,01$) встановлено збільшення площі поперечного перерізу м'язових волокон, тобто зменшення темпу їх атрофії. Зареєстровано тенденцію збільшення кількості активованих міо ядер та їх площі, що вказує на збільшення синтетичного, тобто функціонального потенціалу збережених волокон. Отримані дані свідчать про те, що застосування суспензії жирової тканини у місці травми запобігає гіпотрофії денервованого м'язу, в основі чого активація регенерації хірургічно відновленого нерва і пригнічення розвитку оксидативного стресу. Тобто клітини жирової тканини і їх продукти метаболізму запобігають вторинному метаболічному ушкодженню скелетного м'язу і створюють сприятливі умови для реіннервації.

У дослідній групі 4, якій вводили суспензію червоного кісткового мозку, виявлено різний рівень змін гістологічної організації м'язу. Гіпотрофічний процес виражається у зменшенні товщини м'язових волокон, фрагментарний некроз окремих міосимпласнів, втраті поперечної посмугованості. Поперечна посмугованість зберігається лише в деяких волокнах окремих міонів. У деяких випадках реєстрували поздовжнє розщеплення атрофованих волокон.

Поширення морфології денервованих м'язів було неоднорідним. В одних міонах атрофія рівномірно захоплює всі м'язові волокна; в інших відмічено ознаки гіпертрофії поодиноких м'язових волокон. Загальна гістологічна структура скелетних м'язів була збереженою.

Характерною ознакою трансплантації червоного кісткового мозку в зону аутопластики було амітотичне розмноження міо ядер, яке проявлялося їх суттєвим збільшенням у симпластах. М'язові волокна із ознаками гіперплазії міо ядер зберігали об'єм цитоплазми та рівень профарбованості. На думку багатьох авторів збільшення кількості міо ядер є початковим проявом регенерації м'язової тканини.

Відмічено незначне збільшення щільності сполучної тканини периневрію у гіпотрофованому м'язі, активованих фіброblastів і розволокнених колагенових пучків (рис. 3.5).

Морфометричний аналіз достовірно підтвердив позитивний вплив введення суспензії кісткового мозку до зони травми. Зокрема встановлено збільшення кількості міодер в симпластах на 13,1% ($p=0,02$), виражену тенденцію збільшення площі функціонально активних ядер (в середньому на рівні 24%). Разом з тим об'єм збережених м'язових волокон порівняно із групою порівняння без введення суспензії клітин залишився не змінним.

Тобто гістологічні та морфометричні результати дослідження дозволили встановити, що застосування суспензії червоного кісткового мозку активують регенеративні процеси сідничого нерва і денервованого м'язу, що на морфологічному рівні проявляється у проростанні нервових осьових циліндрів і зменшенні атрофії міонів м'язу, а на метаболічно рівні відновлює функціонування ензиматичної системи антиоксидантного захисту.

У групі 5 комплексного застосування суспензії жирової тканини і червоного кісткового мозку після аутопластики також виявлено позитивний перебіг періоду денервації. Гістологічними змінам м'язової гіпотрофії при тривалій денервації були: зміна діаметру м'язових волокон (наявність як витончених, так і набряклих або гіпертрофованих волокон); збільшення кількості міоядер; некроз, деструкція і елімінація окремих м'язових волокон; збільшення сполучної тканини перимізію. Часто реєстрували збільшені в об'ємі волокна з активованими ядрами, що втратили свою нормальну поперечну смугастість. Їх можна вважати такими, що перебували в стані регенерації (рис. 3.6).

В окремих ділянках м'язу спостерігали ділянки фокального інтерстиційного фіброзу, що має більш виражений характер в периневрію та навколо магістральних кровоносних судин. Тобто на морфологічному рівні цитопротекторний вплив та регенеративний процес м'язової тканини при трансплантації кісткового мозку чи жирової тканини принципово не відрізнялися між групами порівняння.

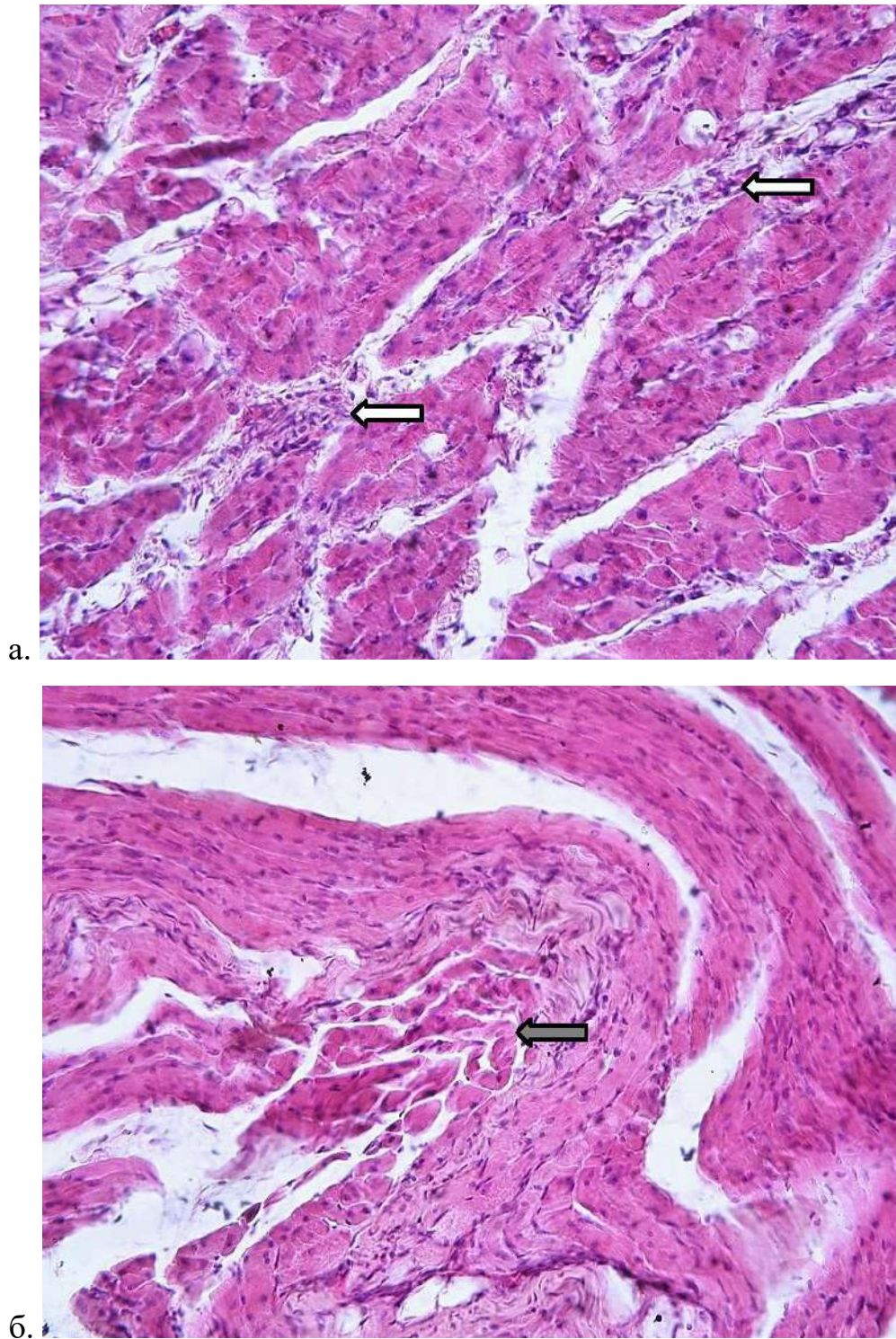




Рис. 3.5 Гіпотрофічні зміни скелетного м'язу після аутопластики сідничого нерва та трансплантації кісткового мозку (група 4). Некроз окремих м'язових волокон, збільшення щільності міо ядер, порушення гістологічної структури м'язу. Примітка:  фібротичні зміни перимізію;  коагуляція, атрофія м'язового волокна. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10

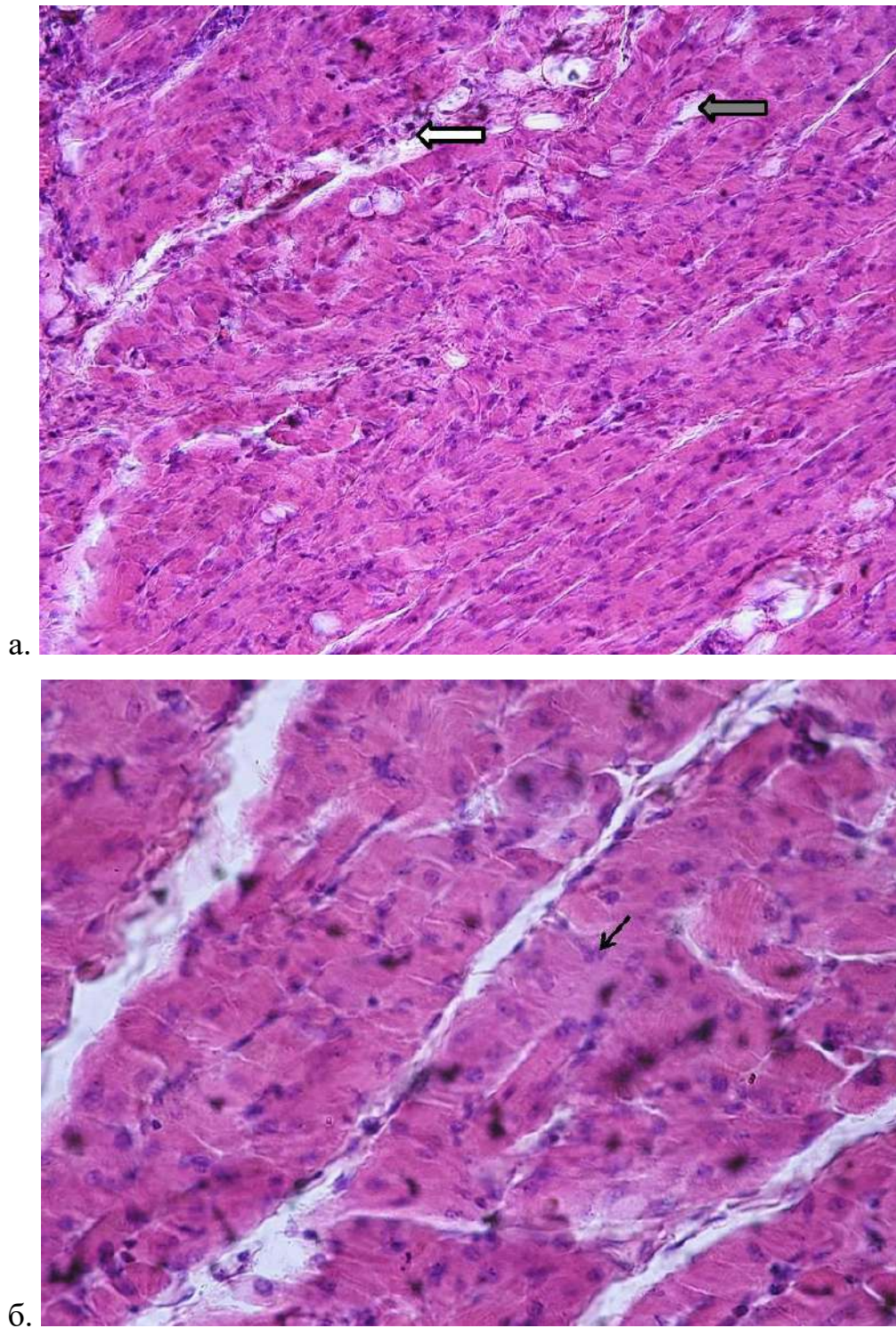


Рис. 3.6 Гістологічна структура скелетного м'язу при аутопластиці та трансплантації кісткового мозку і жирової тканини (група 4). Примітка: **⇐** фібротичні зміни перимізію; **⇐** некроз м'язового волокна; **←** міодря. Гематоксилін-еозин. а: Об. 20, ок. 10; б: Об. 40, ок. 10

Зважаючи на це було проведено порівняльний аналіз морфометричних показників скелетного м'язу дослідних груп. Порівнюючи з групою 2 пластики нерва встановлено суттєву різницю за досліджуваними показниками: площа поперечного перерізу м'язових волокон збільшилася на 79,2% ($p < 0,01$), кількість міомер на симпласт збільшилася в середньому на 40,6% ($p < 0,01$), а площа активованих ядер на 43,5% ($p < 0,01$).

Тобто комбінована трансплантація клітинного матеріалу дозволяє досягти суттєвого протекторного впливу щодо атрофії тривало денервованого м'язу.

Порівняльний аналіз групи 5 із групами ізольованого застосування суспензії клітин отримано наступні дані: товщина м'язових волокон в середньому збільшилася в 1,4 і 1,5 разів ($p < 0,01$), число міомер на симпласт – в 1,5 і 1,2 разів ($p < 0,01$), площа ядер м'язових волокон збільшилась майже на 20% щодо групи з трансплантацією жирової тканини і виражену тенденцію до групи застосування червоного кісткового мозку. Тобто комбіноване нанесення на зону травми обох досліджуваних суспензій в більшій мірі ніж їх ізольоване застосування дозволяє зменшити темпи розвитку гіпотрофічного процесу, проте навіть досить позитивні результати дослідження показали виражені деструктивні зміни м'язової тканини. На гістологічному рівні майже в 1,5 рази зменшився об'єм збережених м'язових волокон від рівня контрольних показників, хоч загальна структурна організація на органному рівні залишилася збереженою і навіть встановлено прояви активації репаративних процесів.

Висновки до розділу 3.2. Узагальнюючи результати гістологічних та біохімічних досліджень можна зробити декілька важливих висновків (табл. 3.5):

1. Аутопластика нерва забезпечує можливість хірургічного та функціонального відновлення ушкодженого нерва. У відповідь на травму та денервацію відбувається компенсаторна активація систем антиоксидантного захисту нерва та м'язів – каталази.

Таблиця 3.5

Узагальнюючі результати напівкількісного аналізу структурно-функціональних змін на рівні травматичного

ушкодження нейрон-м'язових взаємодій

Група	Регенерація центрального сегмента	Регенерація у дислязичній відділі	Ендоневральний фіброз	Активация нейролемоцитів	Каталаза	GRx	GR	DT-діафораза	ТБК-реагуючі продукти	ДК	Карбонильні групи	Вільні SH-групи
Нерв	Пластика (група 2)	-	2+	+	2+	+	+	+	2+	2+	2+	+
	ТЖТ (група 3)	-	+	+	+	3+	3+	+	+	+	+	2+
	ТКМ (група 4)	+	+	+	+	2+	2+	2+	+	+	+	+
	Комплекс (група 5)	+	+	+	2+	2+	2+	4+	+	+	+	2+
М'яз	Пітрофія м'язових волокон	Піерплизія м'яздер	Активация м'яздер	Набряк тканини м'язу	Каталаза	GRx	GR	DT-діафораза	ТБК-реагуючі продукти	ДК	Карбонильні групи	Вільні SH-групи
	Пластика (група 2)	+	2+	3+	3+	+	+	+	2+	3+	3+	+
	ТЖТ (група 3)	+	3+	2+	2+	2+	2+	3+	+	2+	+	3+
	ТКМ (група 4)	2+	3+	2+	2+	+	+	4+	+	2+	2+	2+
Комплекс (група 5)	+	3+	3+	+	+	+	4+	+	2+	+	2+	

2. Аутологічна суспензія жирових клітин стимулює нейролемоцити ушкодженого нерва, регенерацію нервових волокон нерва; на метаболічному рівні активує системи глутатіону – синтез глутатіону, ферментів його відновлення. Запобігає атрофічні зміни денервованого м'язу, активує збережені м'язові волокна, забезпечує компенсацію DT-діафрази та рівня глутатіону.
3. Аутологічна суспензія клітин червоного кісткового мозку активує регенерацію ушкодженого нерва у дистальній відділ, частково активує систему захисту від оксидативного стресу. Метаболічна підтримка денервованого м'язу реалізується на рівні DT-діафрази та глутатіону, частковому відновленні про-та антиоксидантної рівноваги, що пригнічує дистрофічні зміни органу.
4. Комбіноване застосування суспензії жирових клітин та мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку забезпечує регенерацію нерва крізь сегмент аутопластики, активує нейролемоцити нерва, активує DT-діафразу та відновлює рівень глутатіону, тобто нейтралізує післятравматичне оксидативне ушкодження. Суспензія аутологічних клітин активую денерваційну регенерацію м'язів, відновлює про-та антиоксидантну рівновагу, що запобігає гіпотрофії м'язової тканини.
5. Негативними чинниками травматичної хвороби нерва є: ендоневральний фіброз, вторинне біохімічне ушкодження кінцівки, що потребує активації своєчасної регенерації нерва та додаткової нейтралізації продуктів пероксидації дериватів валлерівської дегенерації та місцевої і системної антиоксидантної підтримки.

Публікації в яких наведено результати досліджень розділу 3:

1. Гайович І.В. Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження) / Гайович І.В., Савосько С.І. // Травма. - 2018 - №2 (19). - С. 51-61.
2. Гайович І.В. Нейрометаболічні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва / Гайович І.В., Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. // Вісник морської медицини. - 2018. - №1 (78). - С. 74-84.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІДНОВНИХ ПРОЦЕСІВ У ТРАВМАТИЧНО УШКОДЖЕНОМУ СІДНИЧОМУ НЕРВІ ТА М'ЯЗАХ ГОМІЛКИ У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ

4.1. Результати досліджень регенерації сідничого нерва після невротомії та пластики

Через 3 місяці після пластики дефекту сідничого нерва в групі 2 встановлено значний рівень регенерації нерва у дистальний сегмент. Як і у попередньому терміні спостереження чітко реєстрували проксимальний сегмент, зону шва і дистальний сегмент (рис. 4.1). Регенераційна неврома була меншою за об'ємом щодо 1-го місяця дослідження. Навколо шва відмічено сполучнотканинний рубець, але це не заважало регенеруючим нервовим волокнам проростати у дистальний відрізок нерва. Проксимальний відділ характеризувався збереженими стромальними елементами нерва, чітко реєстрували епіневрій, периневрій та елементи ендоневрію. Проте значна кількість нервових волокон мала ознаки вторинної дегенерації. На морфологічному рівні це проявлялось у порушенні імпрегнації, фрагментарній імпрегнації волокон, фрагментації нервових волокон (рис. 4.2). Середня кількість нервових волокон становила $8478,7 \pm 193,6$ од/мм³, що складає 88,3% ($p < 0,05$) від контрольного показника і на 73,2% більше порівняно із попереднім терміном дослідження ($p < 0,05$) (табл. 4.1).

У дистальному сегменті сідничого нерва відмічено аналогічну ситуацію. Якщо у терміні 1 місяця ознак регенерації нервових волокон не реєстрували, то у терміні 3 місяців регенерувало в середньому $4773,4 \pm 229,6$ од/мм³ ($p < 0,05$), тобто 49,7% ($p < 0,05$) від контрольного показника. При цьому також відмічено вторинну дегенерацію окремих нервових волокон. На основі отриманих даних можна припустити, що тривала регенерація травматично ушкодженого нерва може

завершуватись дегенерацією нервових волокон при недосягненні іннерваційної мішені.

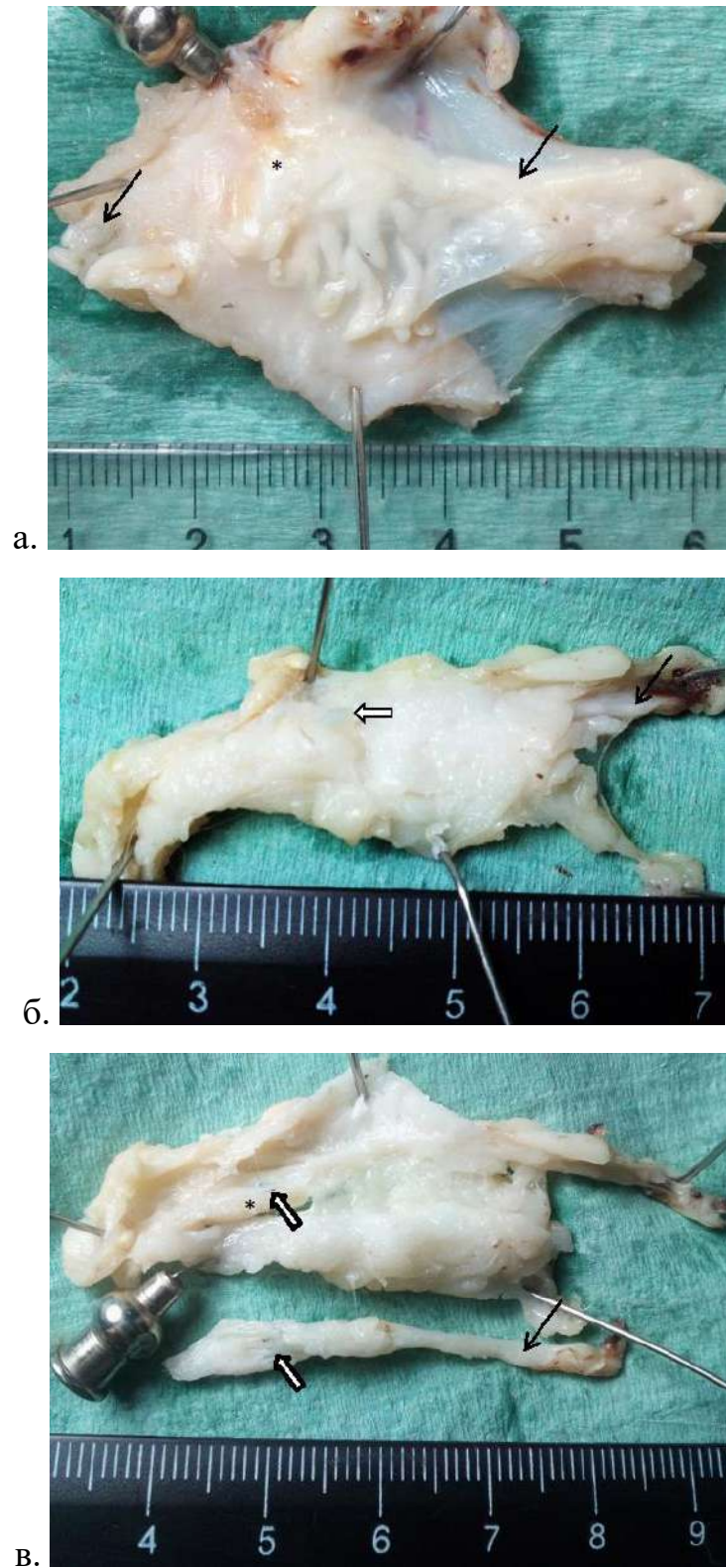


Рис. 4.1 Сідничий нерв через 3 місяці після травми та нейропластики (група 2). Примітка: а – травма; б, в – травма + ТЖТ; ← нерв; ⇌ шов; * – зона шва.

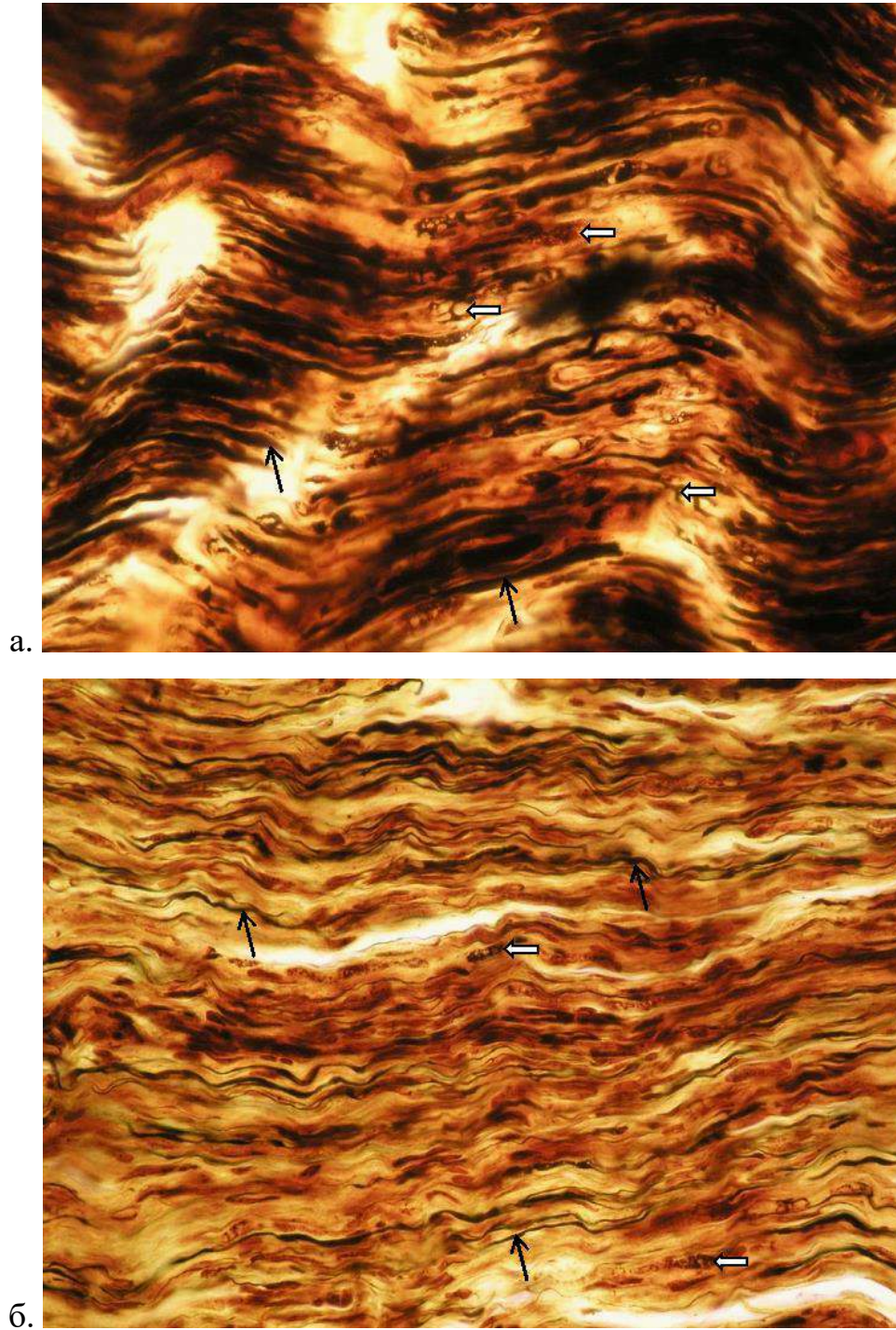


Рис. 4.2. Сідничий нерв тварин через 3 місяці після пластики нерва (група 2). Одночасна регенерація та вторинна дегенерація нервових волокон. Примітка: а – проксимальний відділ; б – дистальний відділ; ← регенеруючі нервові волокна; ⇐ дегенерація волокон. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

Таблиця 4.1

Регенерація сідничого нерва через 3 місяці після аутопластики

Група/сегмент	Щільність нервових волокон, од/мм ³	
	Проксимальний	Дистальний
Контроль (Група 1)	9601,0±285,5	
Пластика (Група 2)	8478,7±193,6a	4773,4±229,6a
ТЖТ (Група 3)	8018,9±346,3a	6477,3±329,5a,b
ТКМ (Група 4)	7329,2±343,9a,b	6166,3±255,9a,b
Комплекс (Група 5)	9154,8±299,0a,b,c,d	6680,1±337,1a,b

Примітка: a – достовірно до контролю ($p<0,05$); b – достовірно до травми ($p<0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p<0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p<0,05$)

У групі 4 тварин з ТКМ рівень регенерації був дещо кращим. У проксимальному відділі сідничого нерва реєстрували фасцикули з нервовими волокнами (рис. 4.3). Кількість нервових волокон була меншою від контролю на 23,6% ($7329,2\pm 343,9$ од/мм³) і на 13,5% ($p<0,05$) порівняно з групою 2 з пластикою без ТКМ. Нервові волокна були різного рівня ремієлінізації, стромальні елементи нерва також чітко реєстрували.

У дистальному відрізьку нерва число регенованих нервових волокон становило $6166,3\pm 255,9$ од/мм³, що на 29,1% більше від групи 2 ($p<0,05$), але не досягало рівня контролю (всього 64,2%, $p<0,05$). Порівнюючи з терміном 1-го місяця спостереження рівень регенерації збільшився майже у 7,2 разів. Проте, як і у групі 2, мало місце вторинна дегенерація нервових волокон, хоча ступінь цих змін був меншим порівняно із групою 2.

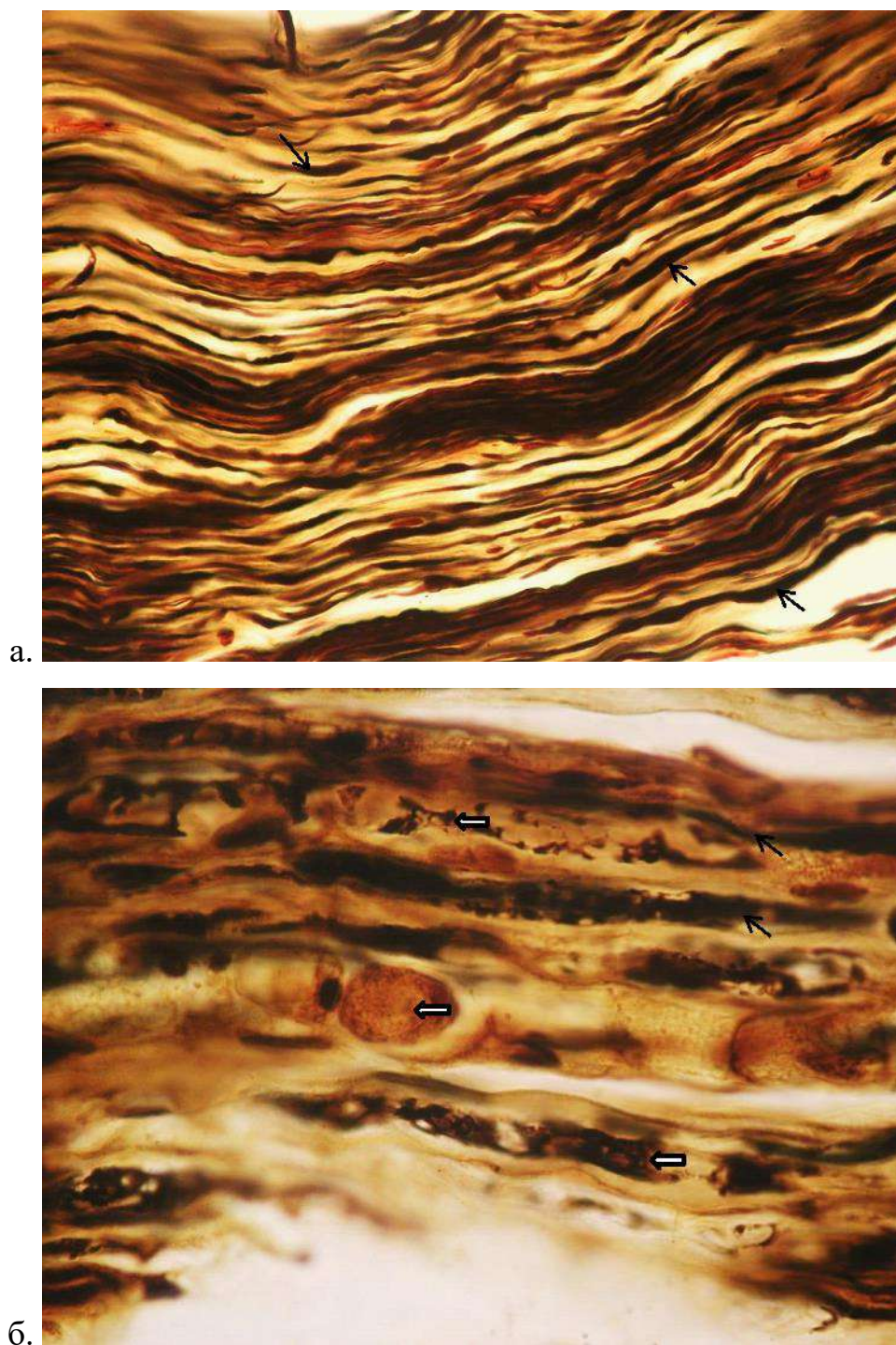


Рис. 4.3 Сідничий нерв тварин через 3 місяці після пластики нерва та ТКМ (група 4). Розвиток вторинної дегенерації нервових волокон у дистальному сегменті нерва. Примітка: а – проксимальний відділ; б – дистальний відділ; ← регенеруючі нервові волокна; ⇐ дегенерація волокон. Імпрегнація азотнокислим сріблом. а: об. 40, ок. 10; б: об. 100, ок. 10

Можна припустити, що ТКМ лише на початковому етапі відновного процесу сприяє регенерації осьових циліндрів, здійснює нейротрофічну та метаболічну підтримку нерва, а у подальшому цей цитотрофічний потенціал вичерпується в силу елімінації клітин ТКМ.

У 3ій групі тварин з ТЖТ рівень відновним процесів у сідничому нерві за якісними та кількісними змінами був суттєво більшим порівняно із групами порівняння (рис. 4.4, табл. 4.1). У проксимальному та дистальному сегментах нерва реєстрували фасцикули з частково збереженими елементами строми. В фасцикулах відмічену значну щільність регенованих нервових волокон, рівень ремієлінізації зменшувався в дистальному напрямку. За даними морфометрії кількість нервових волокон у проксимальному відділі становила $8018,9 \pm 346,3$ од/мм³, менше від контролю на 16,4% ($p < 0,05$) і не відрізнялась від групи 4 з пластикою і ТКМ.

У дистальному відрізку нерва число регенованих нервових волокон становило $6477,3 \pm 329,5$ од/мм³, що на 35,6% більше від групи порівняння ($p < 0,05$), але не досягало рівня контролю (всього 67,4% від контролю, $p < 0,05$).

Тобто, ТЖТ суттєво сприяла регенерації нерва і стимулювала як відновні процеси, так і запобігала розвитку вторинної дегенерації у віддалений період. Ці дані вказують на те, що формування жировою оболонкою з ТЖТ навколо зони шва не лише пригнічує розвиток сполучнотканинного рубця, обмежує розвиток невроми, але і підтримує нерв у продовж тривалого часу відновлення, що суттєво позначилося на регенерації нерва.

У групі 5 з комплексною ТКМ і ТЖТ відновні процеси були також достатньо значущими. Структура нерва на рівні проксимального та дистального відрізків була достатньо збереженою, в фасцикулах реєстрували значну кількість регенованих нервових волокон. Явищ вторинної дегенерації не відмічено (рис. 4.5).

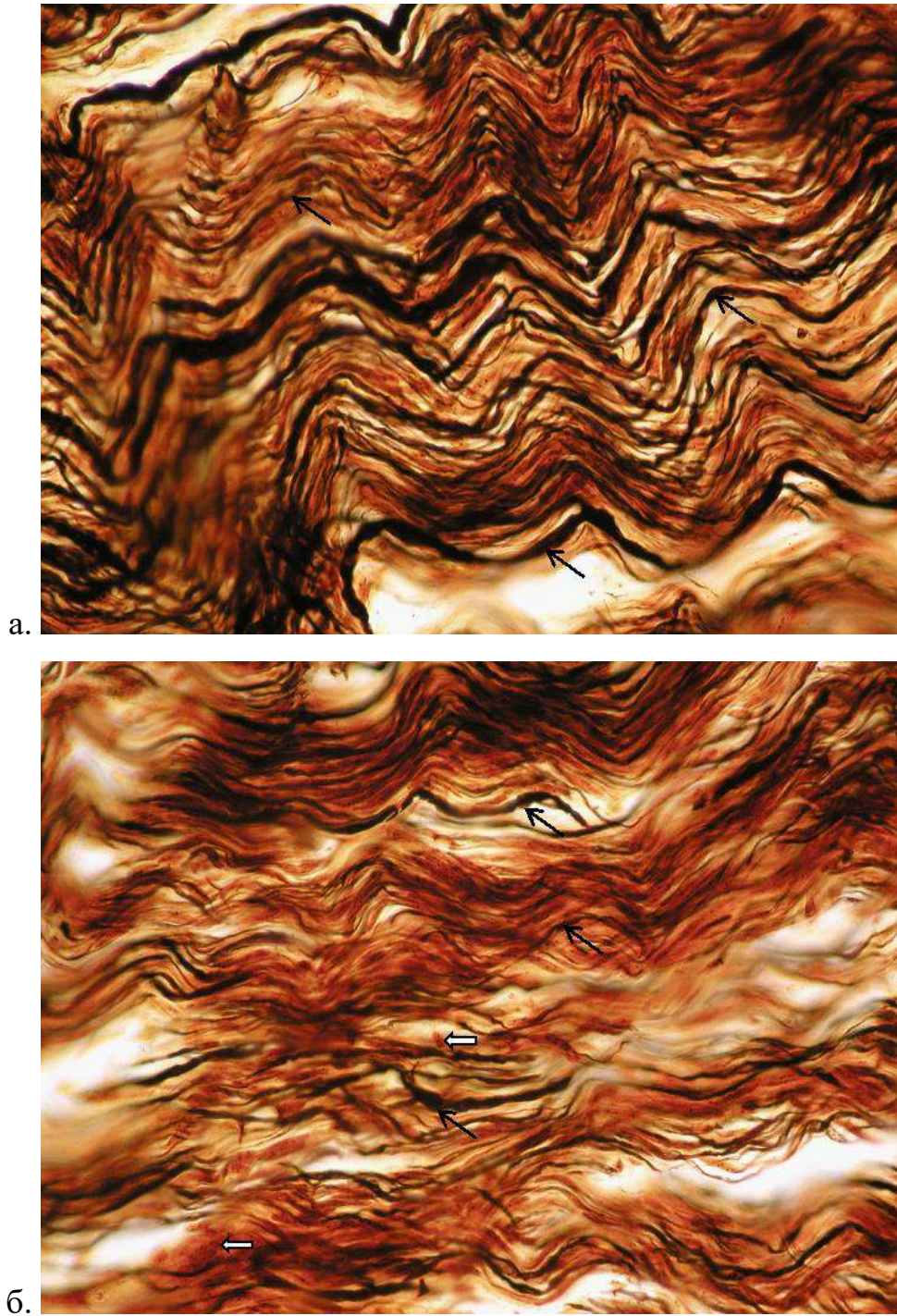


Рис. 4.4 Сідничий нерв тварин через 3 місяці після пластики нерва та ТЖТ (група 3). Значний рівень регенерації нервових волокон у дистальний сегмент нерва. Примітка: а – проксимальний відділ; б – дистальний відділ; ← регенеруючі нервові волокна; ⇔ нейролемоцит. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

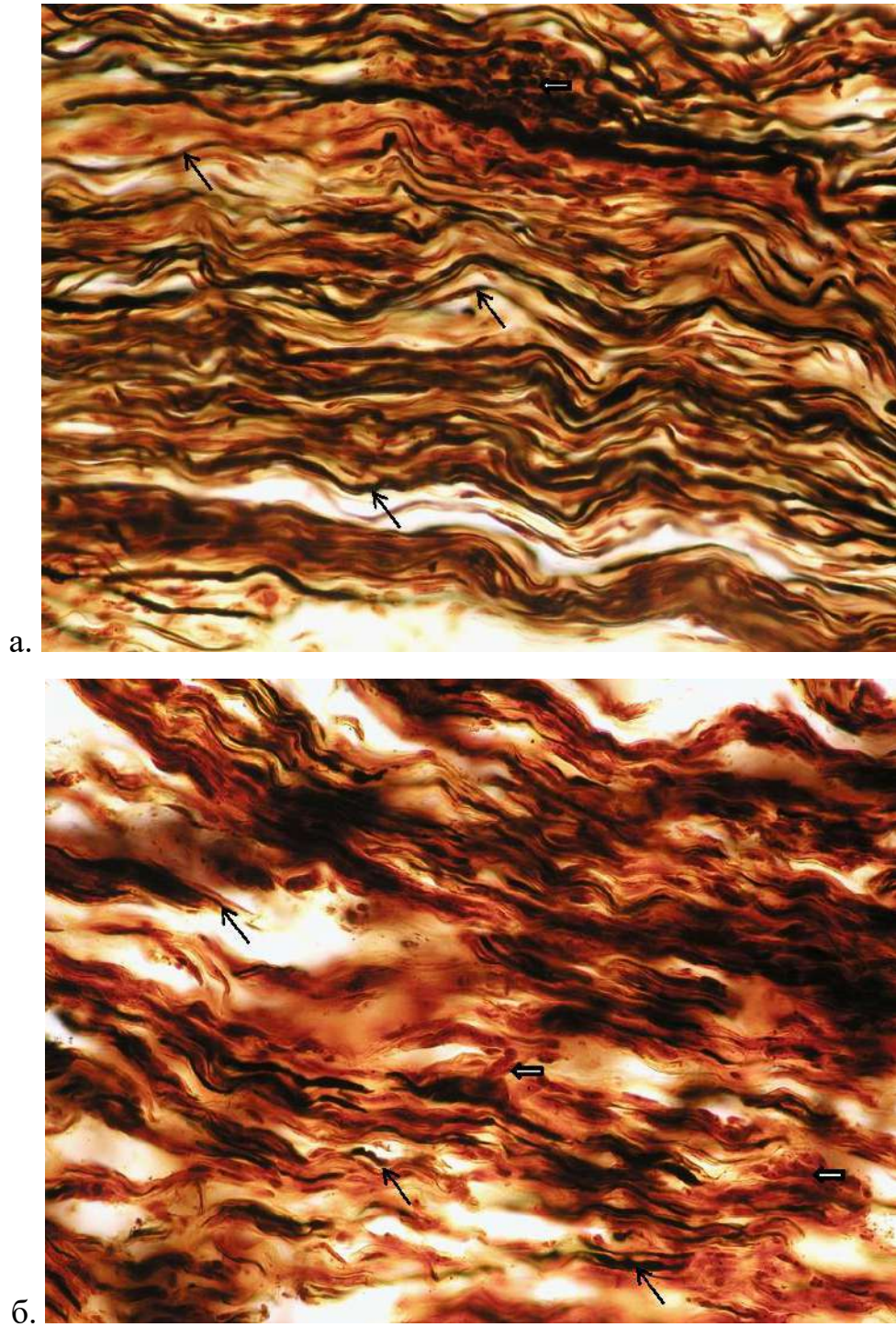


Рис. 4.5 Сідничий нерв тварин через 3 місяці після пластики нерва та ТКМ з ТЖТ (група 5). Регенерація нервових волокон у дистальний сегмент нерва. Примітка: а – проксимальний відділ; б – дистальний відділ; ← регенеруючі нервові волокна; ⇐ нейролемоцит. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10

За даними морфометрії кількість нервових волокон у дистальному відділі становила $9154,8 \pm 299,0$ од/мм³, що складає 95,3% від показника у інтактних тварин (табл. 4.1) і перевищує дані, отримані у групах порівняння. Так порівняно з травмою без трансплантації рівень регенерації був більшим на 7,9% ($p < 0,05$).

Висновки до розділу 4.1. У дистальному відділі нерва кількість нервових волокон збільшилась до $6680,1 \pm 337,1$ од/мм³, тобто на 39,9% більше щодо показника у групі 2 ($p < 0,05$). Порівнюючи із даними отриманими у терміні 1-го місяця слід зазначити, що рівень регенерації нерва збільшився майже у 6,5-7 разів. Ці результати свідчать про те, що застосування ТЖТ і ТКМ одночасно з пластикою великих дефектів дозволяє своєчасне створити сприятливе мікросередовище для регенерації ушкодженого нерва. Проте успішна регенерація нерва не обов'язково запобігає атрофії м'язів і забезпечує їх реіннервацію та функціональне відновлення. Тому додатково було проведено дослідження гістологічних змін м'язів гомілки у віддалений період після травми та пластики нерва.

4.2. Результати досліджень структурних змін м'язів гомілки після невротомії та пластики сідничого нерва

При дослідженні гістологічних змін у м'язах гомілки дослідних груп тварин встановлено прогресування атрофічних змін порівняно з терміном 1-го місяця. У тварин, яким після пластики нерва не здійснювали трансплантацію, структурна організація м'язу як органу була суттєво порушена. Різко зменшилась щільність м'язових волокон, збільшилась щільність строми м'язу, а у деяких зразках навіть строма навіть домінувала над кількістю м'язових волокон (рис. 4.6). При гістологічному дослідженні виявляються дистрофічні зміни м'язових волокон, коагуляцію білкового вмісту волокон. Товщина м'язових волокон суттєво була меншою порівно з контролем. Реєстрували поодинокі вогнища інфільтрації мононуклеарних фагоцитів, стазові мікросудини з ознаками гемолізу.

Результати морфометрії засвідчили наступні зміни. Площа поперечного перерізу становила $589,1 \pm 50,1$ мкм², що у 2,5 рази менше від контролю ($p < 0,05$)

(табл. 4.2). Площа міоядер становила $89,4 \pm 9,96$ мкм, тобто більше від контрольного показника на 57,9% ($p < 0,05$), а кількість міоядер на м'язове волокно зменшилась до $1,80 \pm 0,34$ од ($p < 0,05$). Кількісні показники підтверджують гістологічні зміни та вказують на одночасну атрофію м'язу і функціональну активацію міоядер у збережених м'язових волокнах.

У групі 4 тварин з пластикою нерва і ТКМ також встановлено атрофію м'язів, але характер атрофічних змін відрізнявся. У міонах домінував некроз по типу вакуолярного розпаду, ступінь якого відрізнявся від набряку і розшарування волокна до вираженої вакуолізації (фрагментарної або повної) (рис. 4.7). У збережених волокнах розподіл міоядер був не рівномірним: реєстрували поодинокі міоядра або вогнищеве збільшення їх щільності. Загальна структурна організація м'язу як органу залишалась збереженою, але кількість атрофованих волокон суттєво відрізнялась між окремими міонами.

Результати морфометричного дослідження засвідчили позитивний вплив ТКМ щодо темпів атрофії денервованого м'язу. Площа поперечного перерізу м'язового волокна становила $1663,3 \pm 179,5$ мкм² і не відрізнялась від контрольного показника, а у порівнянні із даними у групі 2 – більше у 2,8 рази ($p < 0,05$). Але такі високі значення обумовлені як запобіганням атрофії одних волокон, так і набряком інших.

Щільність міоядер також суттєво відрізнялась між окремими волокнами та у межах кожного волокна. За даними морфометрії кількість міоядер на волокно склала $4,06 \pm 0,46$ од, що у 2,2 рази більше, ніж у групі 2 тварин з пластикою без ТКМ. При цьому площа міоядер також була більшою і становила $155,0 \pm 8,17$ мкм², в тому числі перевищуючи контрольний показник. Таким чином, на основі аналізу гістологічних та морфометричних змін можна стверджувати, що ТКМ частково запобігала атрофії скелетних язів гомілки, проте у динаміці атрофія прогресувала.

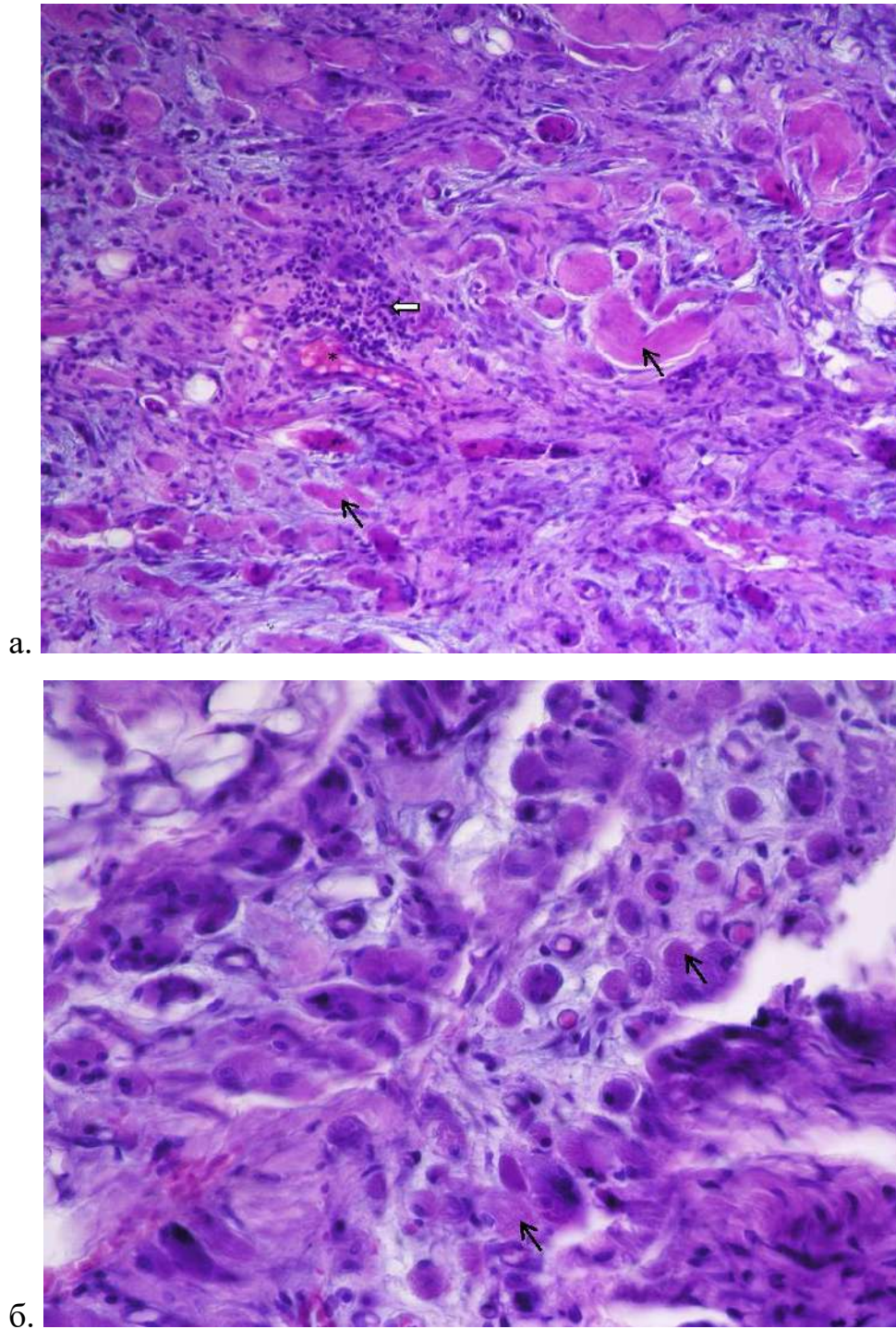


Рис. 4.6 Атрофія м'язів гомілки через 3 місяці після невротомії та пластики нерва (група2). Примітка: ← атрофічні м'язові волокна; ⇔ інфільтрація макрофагів; * стазована мікросудина. Гематоксилін-еозин. а: об. 20, ок. 10; б: об. 40, ок. 10

Таблиця 4.2

Результати морфометричного дослідження скелетних м'язів гомілки через 3 місяці після аутопластики сідничого нерва

Група	Морфометричний показник		
	Площа поперечного перерізу м'язових волокон, мкм ²	Кількість ядер на м'язове волокно, од	Площа ядер м'язових волокон, мкм ²
Контроль (Група 1)	1484,9±150,8	3,06±0,31	56,6±3,40
Пластика (Група 2)	589,1±50,1 P ₁₋₂ <0,001	1,80±0,34 P ₁₋₂ =0,002	89,4±9,96 P ₁₋₂ <0,001
ТЖТ (Група 3)	1740,1±299,7 P ₁₋₃ =0,26 P ₂₋₃ =0,002	3,40±0,63 P ₁₋₃ =0,25 P ₂₋₃ =0,002	159,9±6,27 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ <0,001
ТКМ (Група 4)	1663,3±179,5 P ₁₋₄ =0,24 P ₂₋₄ <0,001	4,06±0,46 P ₁₋₄ =0,01 P ₂₋₄ <0,001	155,0±8,17 P ₁₋₄ <0,001 P ₂₋₄ <0,001
Комплекс (Група 5)	1514,1±463,1 P ₁₋₅ =0,47 P ₂₋₅ =0,04 P ₃₋₅ =0,35 P ₄₋₅ =0,37	3,53±0,39 P ₁₋₅ =0,09 P ₂₋₅ <0,001 P ₃₋₅ =0,38 P ₄₋₅ =0,10	72,6±4,28 P ₁₋₅ <0,001 P ₂₋₅ =0,03 P ₃₋₅ <0,001 P ₄₋₅ <0,001

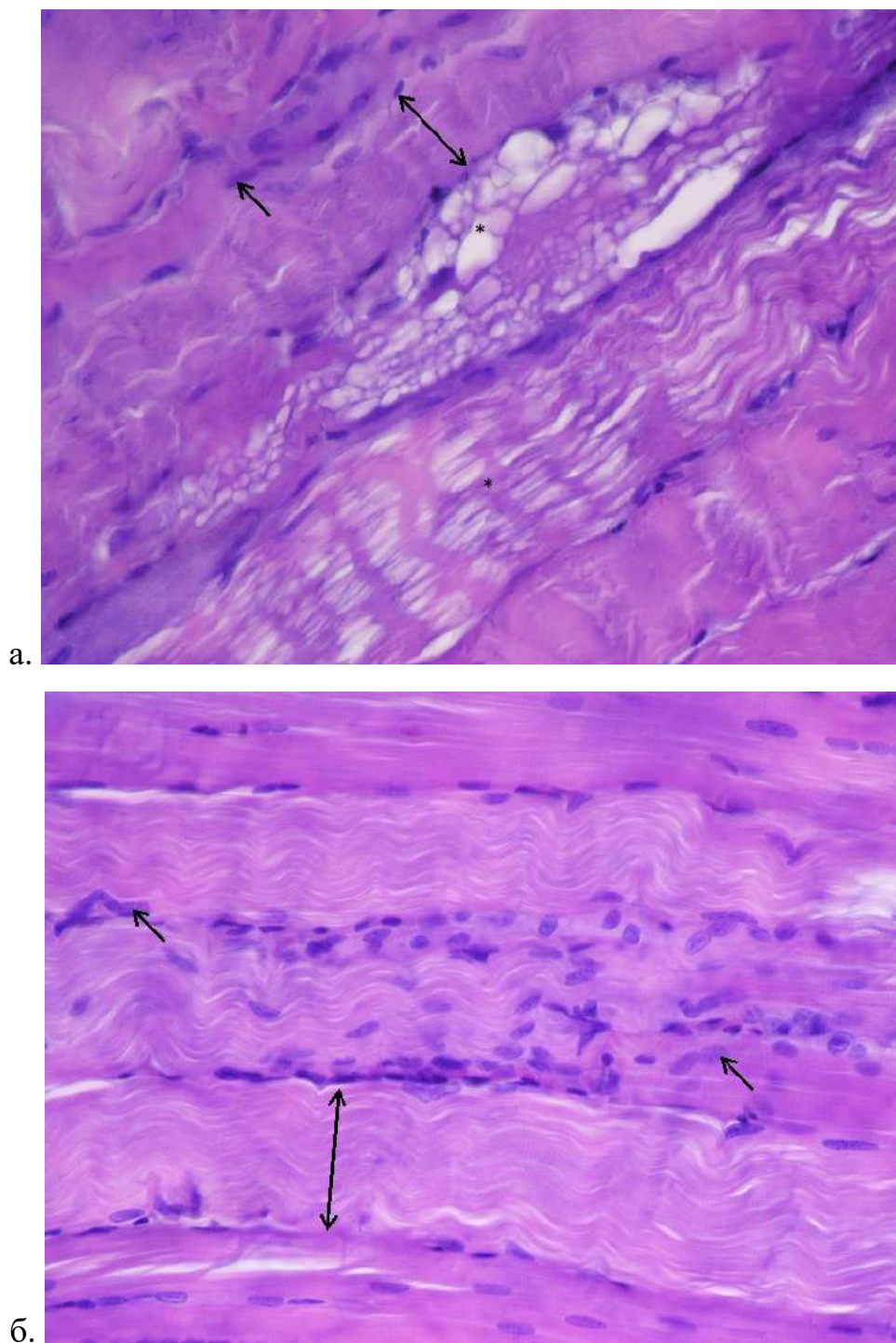


Рис. 4.7 Гіпотрофічні та атрофічні зміни м'язів гомілки через 3 місяці після пластики нерва та ТКМ (група 4). Примітка: \leftrightarrow діаметр м'язового волокна; \leftarrow міодря; * атрофічні м'язові волокна. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10

У 3ій групі тварин, яким після пластики нерва здійснювали ТЖТ, явища атрофії м'язів також реєстрували (рис. 4.8). Як і у попередній групі атрофічні м'язові волокна характеризувалися набряком та розшаруванням білкового вмісту. Поперечна посмугованість реєструвалась у поодиноких волокнах. Міодрa розподілені нерівномірно, відмічено вогнищеве збільшення їх щільності. За даними морфометрії площа поперечного перерізу м'язового волокна становила $1740,1 \pm 299,7$ мкм², що у 2,9 раз більше порівняно з групою 2 без ТЖТ ($p < 0,05$), при цьому не мала статистично значущої різниці із контролем. Площа міоядер становила $159,9 \pm 6,27$ мкм, що більше від групи 2 у 1,7 разів, а з групою 1-контролю у 2,8 разів. При цьому кількість міоядер на м'язове волокно збільшилась у 1,8 раз і становила $3,40 \pm 0,63$ од. Незважаючи на суттєве збереження загальної структурної організації м'язу, рівень атрофії був суттєвим, а компенсаторні зміни у збережених волокнах прогресували порівняно з попереднім терміном спостереження.

У групі 5 з комплексним застосуванням ТКМ з ТЖТ також відмічено виражену атрофію м'язової тканини (рис. 4.9). Характер атрофічного процесу на гістологічному рівні полягав у одночасній атрофії одних волокон і набряку інших, в окремих волокнах некроз розвивався по типу вакуолярного розпаду. Суттєво збільшений обсяг інтерстицію, відмічено набряк м'язової тканини і порушену структуру інтерстицію.

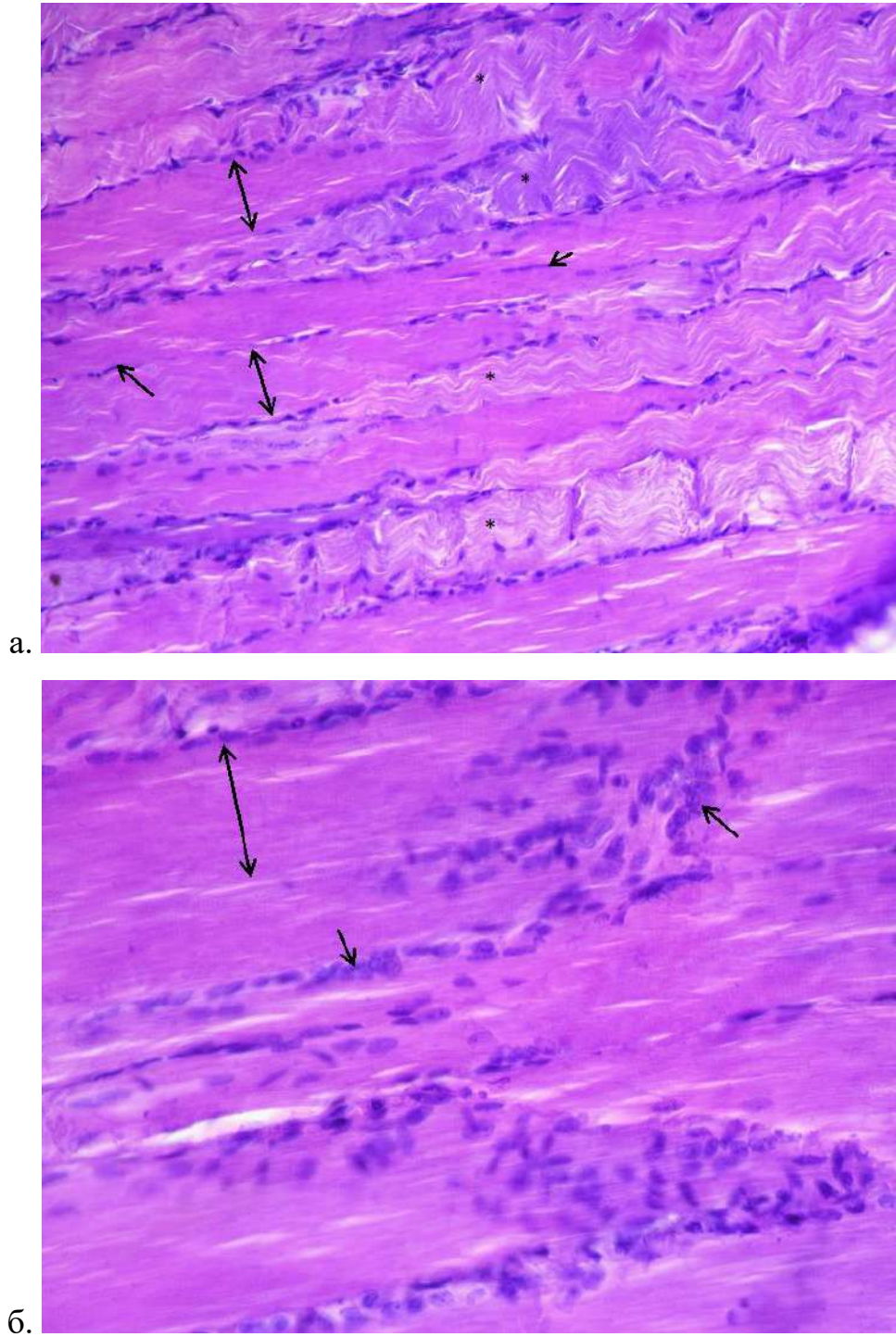


Рис. 4.8 Структурні зміни м'язів гомілки через 3 місяці після пластики нерва та ТЖТ (група 3). Примітка: ↔ діаметр м'язового волокна; ← міодря; ⇐ інфільтрація макрофагів; * атрофічні м'язові волокна. Гематоксилін-еозин. а: об. 20, ок. 10; б: об. 40, ок. 10

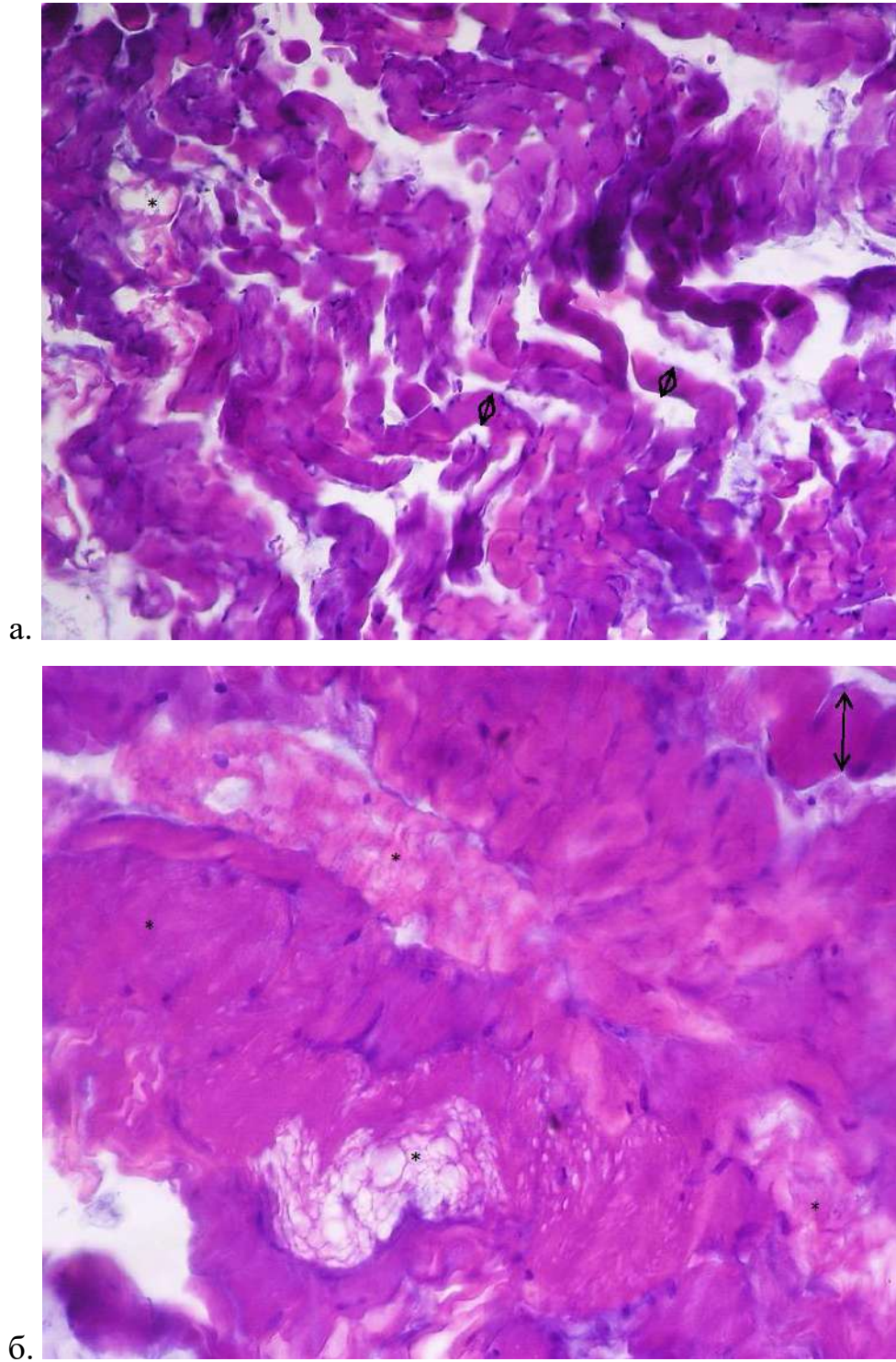


Рис. 4.9 Атрофія м'язових волокон у м'язах гомілки через 3 місяці після пластики нерва та ТКМ з ТЖТ (група 5). Примітка: \leftrightarrow діаметр м'язового волокна; \leftarrow міодря; * атрофічні м'язові волокна. Гематоксилін-еозин. а: об. 20, ок. 10; б: об. 40, ок. 10

Висновки до розділу 4.2. За даними морфометрії середня площа поперечного перерізу м'язових волокон була більшою від показника групи 2 у 2,5 рази і становила $1514,1 \pm 463,1$ мкм² ($p < 0,05$), але це пов'язано головним чином із набряком значної кількості волокон. Площа ядер була меншою від групи 2 та групами ізольованого застосування ТКМ і ТЖТ (групи 5). Середня площа становила зменшилась на 18,7% і становила $72,6 \pm 4,28$ мкм² ($p < 0,05$). При цьому число міоядер у збережених волокнах залишалась суттєво збільшеним, майже у 2 рази ($3,53 \pm 0,39$ од, $p < 0,05$). В загальній динаміці гістологічних та морфометричних змін можна також стверджувати про прогресуючий характер атрофії скелетних м'язів, а комплексне застосування ТКМ і ТЖТ лише частково запобігає атрофії м'язів після пластики великих дефектів.

Публікації в яких наведено результати досліджень розділу 4:

1. Гайович І.В. Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження) / Гайович І.В., Савосько С.І. // Травма. - 2018 - №2 (19). - С. 51-61.
2. Гайович І.В. Нейрометаболичні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва / Гайович І.В., Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. // Вісник морської медицини. - 2018. - №1 (78). - С. 74-84.

РОЗДІЛ 5

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ ТРАВМАТИЧНО УШКОДЖЕНОГО НЕРВА ТА ДЕНЕРВОВАНИХ М'ЯЗІВ ПІСЛЯ ПЛАСТИКИ У ВІДДАЛЕНИЙ ПЕРІОД

5.1. Результати біохімічних досліджень сідничого нерва

Результати оцінки метаболічного статусу сідничого нерва і скелетних м'язів гомілки через 1 місяць після травми та пластики нерва засвідчили компенсаторні ферментативні відповіді у відповідь на змінену систему окисно-відновних реакцій. При цьому на тлі ТКМ і ТЖТ відмічено позитивну їх дію щодо пероксидації ушкоджених тканин, а саме шляхом активації антиоксидантних систем. Проте короткотермінові реакції не обов'язково мають пролонговану дію в травматично та ішемічно уражених тканинах, що потребувало додаткового їх аналізу через 3 місяці після пластики нерва.

Аналіз рівня продуктів пероксидації показав деякі особливості метаболічного ураження сідничого нерва. Так, рівень ТБК-ативних продуктів, ДК, карбонільних груп залишався високим порівняно із контрольним показником в середньому у 1,6-2,2 рази ($p < 0,05$). Порівняно із показником на 1-й місяць після травми перші 2 показники статистично значимо зменшились в середньому на 1,3-1,7 рази ($p < 0,05$), а рівень карбонільних груп збільшився не суттєво – на 16% ($p < 0,05$). Тобто можна стверджувати про зменшення темпів реакцій пероксидації у тривало денервованому м'язі (табл. 5.1). Разом з тим ендогенні системи антиоксидантного захисту залишалися активованими. Так, рівень вільномолекулярних SH-групи, дія яких спрямована на утилізацію АФК, був зменшеним майже у 2,4 рази ($p < 0,05$), хоча системи ензиматичного захисту залишалися активованими.

Активність каталази була більшою на 20%, активність GPx збільшилась у 3,4 рази, а GR і DT-діафрази – у 4,8 рази (табл. 5.2). Порівняно із попереднім терміном спостереження функціонування антиоксидантної системи змінилась

наступним чином: рівень каталази зменшився у 1,7 разів, а наступних показників збільшився відповідно у 5, 9,7 і 19,2 рази ($p < 0,05$). Ці результати додатково підтверджують дані щодо незадовільної регенерації нерва, прогресуючого характеру розвитку атрофії м'язів гомілки на тлі тривалої денервації. Висока активність ферментів і її негативна динаміка вказують на виражені метаболічні порушення і пояснюють причину розвитку вторинної дегенерації у дистальному сегменті нерва.

Таблиця 5.1

Метаболічні зміни окисно-відновного профілю у дистальному фрагменті сідничого нерва після аутопластики дефекту нерва

Група	Рівень продуктів перекисного окиснення			Вільні низько-молекулярні SH-групи, нмоль/мг протеїну
	ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг протеїну	ДК, нмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	
Контроль (Група 1)	0,86±0,06	1,03±0,06	0,89±0,04	16,80±0,50
Пластика (Група 2)	1,32±0,07 a	2,40±0,16 a	1,92±0,09 a	6,90±0,12 a
ТЖТ (Група 3)	1,40±0,07 a	2,46±0,16 a	1,96±0,09 a	8,00±0,73 a
ТКМ (Група 4)	1,80±0,04 a,b	2,40±0,10 a	2,09±0,07 a	6,81±0,09 a
Комплекс (Група 5)	1,87±0,11 a,b	2,50±0,12 a	2,10±0,08 a	8,26±0,93 a

Примітка: a – достовірно до контролю ($p < 0,05$); b – достовірно до травми ($p < 0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p < 0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p < 0,05$)

Таблиця 5.2

Зміни активності ферментативних систем дистального фрагмента сідничого нерва після аутопластики дефекту нерва

Група	Рівень білка, мг/мл	Активність ферментів антиоксидантного профілю			Активність ензиму DT-діафори, нмоль/мг/хв
		Каталаза, нмоль/мг протеїну	GPx, нмоль/мг протеїну	GR, нмоль/мг протеїну	
Контроль (Група 1)	2,10±0,05	14,90±0,21	1,04±0,02	2,15±0,02	2,39±0,06
Пластика (Група 2)	3,82±0,66	17,88±1,69	3,53±0,04 a	10,43±0,26 a	1,25±0,08 a
ТЖТ (Група 3)	2,63±0,11	23,77±0,12 a	2,83±0,18 a,b	7,66±0,10 a,b	1,39±0,07 a
ТКМ (Група 4)	3,37±0,15 a	10,25±0,10 a,b,c	3,83±0,08 a	8,53±0,06 a,b,c	1,38±0,10 a
Комплекс (Група 5)	3,55±0,19 a	10,38±0,66 a,b,c	6,46±0,06 a,b,c,d	13,5±0,04 a,b,c,d	1,11±0,06 a

Примітка: a – достовірно до контролю ($p<0,05$); b – достовірно до травми ($p<0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p<0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p<0,05$)

У групах тварин, яким проводили ТЖТ і ТКМ суттєво різниці із групою 2 на 3-й місяць спостереження не виявлено. Різницю встановлено лише за деякими показниками. Так, рівень ТБК-реагуючих продуктів на 36,3% ($p<0,05$) був більшим після ТКМ, хоча активність каталази і GR зменшились в середньому на 20-30% ($p<0,05$). У групі 3 з ТЖТ аналогічно зменшилась активність GPx і GR на 20-35% ($p<0,05$). Порівнюючи з даними на 1-й місяць спостереження рівень карбонільних груп на тлі ТЖТ і ТКМ були збільшені на 27,2% і 16,1% відповідно ($p<0,05$), статистично значущої різниці між іншими продуктами пероксидації не

відмічено. При цьому встановлено збільшення активності ферментативних механізмів антиоксидантного захисту. Так, показник GPx і GR був збільшеним у 1,5-3,6 раз ($p < 0,05$) залежно від групи, а активність ензиму DT-діафрази при ТЖТ збільшилась у 2 рази ($p < 0,05$), а при ТКМ – зменшилась на 18,7% ($p < 0,05$). Незважаючи на відносну варіабельність одержаних даних загальним висновком є те, що у віддалений період продовжується розвиток компенсаторних захисних механізмів у м'язах і цей рівень має тенденцію до зменшення порівняно із групою без застосування трансплантації, тобто рівень зазначених порушень є меншим.

При комбінованому застосуванні ТЖТ з ТКМ (група 5) показники метаболічних змін у сідничому нерві також відрізнялись від групи порівняння. Рівень продуктів пероксидації залишався без суттєвих змін, лише концентрація ТБК-реагуючих продуктів була збільшеною у 1,4 рази ($p < 0,05$). Активність DT-діафрази і GR збільшилась у 1,3-1,8 разів, аналогічно з групами, де провели ізольовану ТЖК або ТКМ. Активність каталази і GPx зменшилась на 72,2% і 42,6% відповідно ($p < 0,05$). Тобто відмічено розходження різних ензиматичних систем антиоксидантного захисту, проте жоден з них не досягав рівня контрольної групи тварин. У порівнянні із 1-м місяцем після пластики тенденція метаболічних розладів залишалась без суттєвої зміни – різке збільшення активності GPx і GR проти падіння рівня каталази і DT-діафрази, що пояснюється прогресуючим накопиченням у тканині ушкодженого нерва продуктів пероксидації.

Висновки до розділу 5.1. Таким чином, дослідження метаболічних показників травматично ушкодженого нерва через 3 місяці після пластики та застосування ТЖТ і ТКМ в якості засобів стимулювання до регенерації засвідчили часткову нормалізацію реакцій окисно-відносної рівноваги та компенсаторну активацію різних ланок антиоксидантного захисту, що пояснює збільшення рівня регенерації нерва після трансплантації клітинного матеріалу.

5.2. Результати біохімічних досліджень скелетних м'язів гомілки

Результати метаболічних змін тривало денервованих скелетних м'язів гомілки групи 2 показали наступну динаміку: збільшення рівня продуктів пероксидації (МДА, ДК, карбонільних груп) у 2-2,2 рази ($p < 0,05$) проти зменшення вільних низькомолекулярних SH-груп (в середньому на 41,3%, $p < 0,05$) і активації ферментів антиоксидантного захисту (каталази GPx і у 3,7 разів, а GR у 8,1 раз, $p < 0,05$) (табл. 5.3, 5.4). Тобто засвідчено пролонговану динаміку процесів пероксидації, наслідком якого є гіперпродукція цитотоксичних метаболітів, що асоційовано з прогресуючою атрофією м'язів. Порівнюючи із попереднім терміном спостереження встановлено зменшення рівня МДА, ДК, карбонільних груп в середньому у 1,2-1,6 рази ($p < 0,05$) і активація ферментів антиоксидантного захисту. Проте, зважаючи на виражену атрофію м'язових волокон та суттєве збільшення стромальної тканини у м'язі, ці зміни можуть бути пов'язані з реакцією клітин сполучної тканини на ішемію і дисметаболічні розлади.

У групі 3 тварин з ТЖТ статистично значимої різниці рівня МДА, ДК і карбонільних груп з групою порівняння не встановлено. При цьому активність каталази, GPx і GR зменшились майже у 3,5, 2 і 1,7 рази відповідно ($p < 0,05$), що вказує на виснаження антиоксидантної системи у атрофованому м'язі.

У групі 4 з ТКМ динаміка дисметаболічних розладів була аналогічною. Відмічено лише часткове зменшення рівня ТБК-реагуючих продуктів на 27,9% ($p < 0,05$), при цьому активність каталази і GPx збільшилась не суттєво – на 20,1% і 23,9% відповідно ($p < 0,05$).

У групі 5 з комплексним застосуванням ТЖТ з ТКМ редукцію рівня продуктів пероксидації встановлено лише за показником ТБК-реагуючих продуктів і ДК (на 41,9% і 36,4%, $p < 0,05$). Активність каталази була меншою у 3,1 рази ($p < 0,05$), а GPx компенсаторно збільшилась на 27,6% ($p < 0,05$). При цьому активність GPx і GR, як і у інших групах порівняння, залишалась суттєво підвищеною порівняно з контрольним показником. Лише показник каталази і DT-діафрази відповідали значенню контрольної групи. Як загальний висновок слід зазначити, що навіть при комплексному застосуванні ТЖТ з ТКМ у скелетних

м'язів гомілки продовжуються атрофічні зміни, що позначаються як на структурному, так і метаболічному рівнях.

Таблиця 5.3

Метаболічні зміни окисно-відновного профілю у м'язах гомілки після аутопластики дефекту нерва

Група	Рівень продуктів перекисного окиснення			Вільні низькомолекулярні SH-групи, нмоль/мг протеїну
	ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг протеїну	ДК, нмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	
Контроль (Група 1)	0,65±0,04	1,89±0,07	1,80±0,08	13,73±0,52
Пластика (Група 2)	1,43±0,08 a	3,93±0,46 a	3,50±0,20 a	9,43±0,15 a
ТЖТ (Група 3)	1,18±0,02 a	3,20±0,21 a	3,30±0,10 a	9,43±0,20 a
ТКМ (Група 4)	1,03±0,02 a,b	3,60±0,14 a	3,53±0,20 a	9,50±0,38 a
Комплекс (Група 5)	0,83±0,05 b,c	2,50±0,20 b,d	3,02±0,01 a	10,70±0,40 a

Примітка: a – достовірно до контролю ($p < 0,05$); b – достовірно до травми ($p < 0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p < 0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p < 0,05$)

Таблиця 5.4

Зміни активності ферментативних систем у м'язах гомілки після аутопластики
дефекту нерва

Група	Рівень білка, мг/мл	Активність ферментів антиоксидантного профілю			Активність ензиму DT- діафрази, нмоль/мг/хв
		Каталаза, нмоль/мг протеїну	GPx, нмоль/мг протеїну	GR, нмоль/мг протеїну	
Контроль (Група 1)	7,23±0,47	3,80±0,17	1,46±0,04	1,40±0,01	0,80±0,04
Пластика (Група 2)	3,48±0,45 a	14,38±0,56 a	5,43±0,12 a	11,40±0,12 a	0,84±0,04
ТЖТ (Група 3)	4,41±0,13 a	4,05±0,13 b	2,76±0,16 a,b	6,66±0,14 a,b	0,81±0,03
ТКМ (Група 4)	3,59±0,09 a,c	17,83±0,14 a,b,c	6,73±0,04 a,b,c	11,96±0,22 a	0,83±0,04
Комплекс (Група 5)	5,20±0,08 a,b,c,d	4,60±0,23 b,d	6,93±0,09 a,b,c	13,40±0,04 a,c	0,82±0,05

Примітка: a – достовірно до контролю ($p<0,05$); b – достовірно до травми ($p<0,05$); c – достовірно до ТЖТ ($p<0,05$); d – достовірно до ТКМ ($p<0,05$)

Висновки до розділу 5.2. Порівнюючи отримані результати із попереднім терміном спостереження встановлено статистично значуще зменшення рівня продуктів пероксидації та різка активація продукції вільних низькомолекулярних SH-груп та ензимів їх метаболізму – GPx і GR – при комбінованому застосуванні ТЖТ з ТКМ. Ці дані вказують на те, що супутнє їх нанесення у дозу пластики нерва сприяє прологнованій підтримці нерва та м'язів у післятравматичний період.

Публікації в яких наведено результати досліджень розділу 5:

1. Гайович І.В. Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження) / Гайович І.В., Савосько С.І. // Травма. - 2018 - №2 (19). - С. 51-61.
2. Гайович І.В. Нейрометаболичні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва / Гайович І.В., Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. // Вісник морської медицини. - 2018. - №1 (78). - С. 74-84.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження метаболічних показників травматично ушкодженого нерва через 1 та 3 місяці після пластики та застосування ТЖТ і ТКМ в якості засобів стимулювання до регенерації засвідчили часткову нормалізацію реакцій окисно-відносної рівноваги та компенсаторну активацію окремих ланок антиоксидантного захисту, що пояснює збільшення рівня регенерації нерва після застосування аутоогічних клітинних суспензій.

Результати експериментальних досліджень дозволили встановити особливості регенерації сідничого нерва через дефект шляхом використання методу аутопластики. Встановлено, що регенерація у дистальний сегмент нерва відбувається через 1 місяць після пластики, а у цей термін відбуваються гістоструктурні та метаболічні зміни. Через 3 місяці після аутопластики встановлено регенерацію лише на рівні 49,7%.

Нанесення у місці аутопластики суспензії мезенхімальних клітин жирової тканини (ЖТ) і червоного кісткового мозку (ЧКМ), що приготовані з аутоплазмою збагаченою тромбоцитами, позитивно вплинули на регенерацію периферійного нерва після травми. При цьому вплив досліджуваних суспензій мав деякі відмінності.

Суспензія клітин ЖТ вплинула на активацію проростання нервових волокон крізь сегмент аутопластики травмованого нерва, при цьому відмічено ділянки з адипоцитами у епіневрії та збільшення щільності нейролемоцитів у ділянці шва. Жирова тканина містить велику кількість стромальних стовбурових клітин, які безпосередньо пенетрують тканину травмованого сідничого нерва, активують ангиогенез, метаболічний потенціал ендотелію мікросудин, нейролемоцитів, що впливає на регенерацію нервових волокон. Цим можна пояснити збільшення рівня регенерації нервових волокон до 67,4%. Клітини ЖТ сприяли регенерації нерва та запобігали розвитку вторинної дегенерації у віддалений період.

Суспензія клітин ЧКМ суттєво у гострому періоді активувала регенерацію осьових циліндрів і нейролемоцитів, що підтверджується проростанням поодиноких нервових волокон через дистальний шов через місяць після пластики, проте у віддалений період регенерація характеризувалася розвитком вторинної дегенерації, хоча загальна кількість волокон також була у межах 64,2%. Активацію пришвидшення регенерації нервових волокон через ділянку аутопластики можна пояснити виділенням мезенхімальними клітинами та тромбоцитами плазми факторів росту, а причиною дегенеративних змін може бути «агресивне» мікрооточення у дистальному сегменті нерва, що виникає на тлі травми нерва і розвитку окиснювального стресу. Для підтвердження або спростування цієї думки було проведено порівняльний аналіз про- та антиоксидантного профілю ушкодженого нерва після аутопластики.

Гістоструктура нерва після аутопластики мала іншу архітекtonіку порівняно з неушкодженим нервом. Через 1 міс після травми зона аутопластики характеризувалася відновленням анатомічної будови нерва, чітко реєстрували проксимальний і дистальний шви. На гістологічному рівні фасцикули проксимального і дистального сегментів, зона аутопластики суттєво розрізнялися. Епіневрій нерва в тварин дослідної групи представлений товстою смугою щільної сполучної тканини, особливо в ділянці епіневрального шва.

Ділянка дистального шва характеризувалася посттравматичною активацією нейролемоцитів, інкапсуляцією шва, реорганізацією сполучної тканини нерва. Продуктів (дериватів) розпаду нервових волокон не реєстрували, що вказує на їх повну елімінацію з тканини нерва через 1 міс після аутопластики. Коли у терміни 1 міс ознак регенерації нервових волокон через дистальний шов не реєстрували, то у терміни 3 міс встановлено проростання осьових циліндрів у дистальний відрізок нерва у кількості $4773,4 \pm 229,6$ нервових волокон/мм² ($p < 0,05$), тобто 49,7% ($p < 0,05$) порівняно з контрольним показником. При цьому відмічено ознаки вторинної дегенерації окремих нервових волокон. На основі отриманих даних можна припустити, що тривала регенерація травматично ушкодженого нерва

може завершуватись дегенерацією нервових волокон при недосягненні іннерваційної мішені.

У групі 3, тобто аутопластиці з застосуванням суспензії ЖТ, реєстрували кращу посттравматичну регенерацію нерва. На макроскопічному рівні чітко розрізнялись окремі зони нерва (проксимальний, дистальний сегменти і зона аутопластики), але ділянка нанесення жирової тканини за об'ємом сполучної тканини істотно відрізнялась від ділянки після травматичної невроми дослідної групи 2. Так, відмічено збільшення сполучної тканини, утворення «ніжного» сполучної тканини у епіневрії, проростання жирової тканини між фасцикулами нерва. Дистальний сегмент нерва характеризувався збільшенням товщини епіневрію, міграцією активованих фібробластів, стазованими мікросудинами). Основний об'єм досліджуваного сегмента, представлений нейроремоцитами, проте регенерації нервових волокон через 1 міс не встановлено. Через 3 міс у дистальному відрізку нерва число регенованих нервових волокон становило $6477,3 \pm 329,5$ мм², що на 35,6% більше від групи 2 ($p < 0,05$).

У групі 4, аутопластики з ЧКМ (аспірат червоного кісткового мозку), встановлено регенерацію нервових волокон у дистальний сегмент нерва через 1 місяць на рівні $851,9 \pm 54,3$ мм² (8,8% від контролю, $p < 0,05$). Дериватів дегенованих осьових циліндрів і гліоцитів не реєстрували. Дистальний сегмент нерва характеризувався регенерацією поодиноких нервових волокон і зменшенням щільності дедиференційованих нейроремоцитів, що свідчить про відновлення нейро-гліальних взаємодій і зменшення рівня гліальною компенсації. Через 3 міс число регенованих нервових волокон становило $6166,3 \pm 255,9$ мм², що на 29,1 % більше від групи 2 ($p < 0,05$).

У групі 5, тобто комплексного застосування суспензії ЖТ і ЧКМ, також встановлено проростання нервових волокон через дистальний шов. Рівень регенерації у термін 1 місяця становив $906,0 \pm 54,4$ од/мм² (9,4% від контрольного показника, $p < 0,05$), а через 3 місяці – $6680,1 \pm 337,1$ од/мм², тобто на 39,9% більше щодо показника у групі 2 ($p < 0,05$). Нервові волокна формували незначні кластери, між якими локалізовані елементи сполучної тканини, мали різний рівень

мієлінізації, реєстрували поодинокі рекурентні волокна. Ці результати свідчать про те, що застосування ЖТ і ЧКМ одночасно з пластикою великих дефектів дозволяє своєчасне створити сприятливе мікросередовище для регенерації ушкодженого нерва.

Таким чином встановлено достовірну різницю в щільності проростання нервових волокон через шов у всіх групах де застосовувалися клітинні технології порівняно з контролем на рівні $p < 0,05$. Достовірної різниці за щільністю волокон між групами де застосовувалися різні суспензії не виявлено, проте в групі 5 де застосовувалася суміш жирової тканини та аспірату кісткового мозку вона була найвищою, а морфологічно структура параневрального оточення найбільше відповідала здоровій тканині з відтворенням тканини ковзання.

Розвиток окиснювального стресу і наступне перекисне окиснення структурних компонентів клітин (ліпідів плазматичних мембран, білків та нуклеопротейдів) є одним із основних патогенетичних шляхів пошкодження тканин і органів при травматичному і ішемічному ураженні. Підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів є також механізмом розвитку різних сигнальних метаболічних ланок. Темпи перебігу вільнорадикальних процесів та їх регуляція перебувають під контролем багатокomпонентної системи антиоксидантного захисту. Основним проявом окиснювального стресу та параметром оцінки рівня патобіохімічних змін є накопичення первинних і вторинних продуктів вільно-радикального окислення. Найбільш інформативними показниками рівня окисного стресу є утворення дієнових кон'югатів із окиснених ліпідів, а також малонового діальдегіду. МДА виникає в тканинах при деградації поліненасичених жирів на тлі ушкодження активними формами кисню, служить маркером ПОЛ і окиснювального стресу та визначається не лише в тканинах, але і в плазмі крові, тобто є показником системних розладів.

Одночасно з цим відбувається окислювальна модифікація білків. Вільні радикали ушкоджують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи первинну, вторинну і третинну структуру білків, що призводить до

агрегації або фрагментації білкової молекули, тобто втрати її функціонального призначення. Це має відношення не лише до структурних білків мембран та цитоплазми, але і білків позаклітинного матриксу, факторів росту, білків мікросудин. Особливо легко окиснюються білки, що містять у своєму поліпептидному ланцюгу амінокислоти з SH-групами. Особливо це важливо для оцінки стану глутатіонової системи, оскільки глутатіон створює основний пул цієї системи.

Характерним маркером пошкодження білків за умов окиснювального стресу є утворення карбонільних груп при окисленні амінокислот: лізину, аргініну і проліну. Карбоксильні групи білків під дією АФК перетворюються в карбонільні групи, які, в свою чергу, можуть взаємодіяти з аміногрупами, що в остаточному підсумку призводять до утворення поперечних зшивок між білковими молекулами і порушення їх активності.

У проведених експериментальних дослідженнях було встановлено, що через 1 місяць після ушкодження сідничого нерва та його аутопластики відбувається розвиток ПОЛ та деградація білків у дистальному сегменті нерва, що є результатом травматичного, ішемічного та метаболічного ушкодження. Основними показниками цих розладів є: 1) утворення ТБК-активних продуктів (продукти ПОЛ, що взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою), основним компонентом яких є МДА; 2) утворення ДК; 3) поява карбонільних груп в ушкоджених протеїнах; 4) ушкодження та зменшення рівня метаболічно активних вільних низькомолекулярних SH-груп, основним компонентом яких є глутатіон. Глутатіон є низькомолекулярним антиоксидантом і може брати участь у неферментативному антиоксидантному захисті, виступаючи ефективним акцептором вільних радикалів. Зниження рівня глутатіону викликає зростання рівня АФК, піддає клітку ризику окисного пошкодження. Разом з тим надлишкова продукція глутатіону є індикатором розвитку окисного стресу, що згодом приводить до клітинної загибелі.

Синтез глутатіону *de novo* та його відновлення реалізується за АТФ-залежним шляхом, тобто порушення мітохондріальної функції корелює із

зниження відновленого глутатіону. Враховуючи це важливим було оцінити рівень метаболічних розладів мітохондрій. Одним із таких показників є активність DT-діафори (NAD(P)H-хіноноксидоредуктази; КФ 1.6.99.2) – фермент, синтез якого активується при оксидативному стресі і який бере участь, принаймні, в трьох системах біохімічних реакцій: 1 – відновленні хінонів, 2 – підтримання ендогенних антиоксидантів у відновленій активній формі і 3 – регуляція стабільності пухлинного супресора – протеїну p53. Крім того, DT-діафора координовано стимулюється з іншими ензимами детоксикації, такими як глутатіон-S-трансфераза.

Рівень пулу вільних SH-вмісних молекул, основу якого складає глутатіон, в гострому періоді зростала лише у групах де, були використана суспензія клітин ЖТ (група 3 і 5), але у 3-місячний термін не відрізнялась від групи порівняння, що вказує на виснаження пулу цих антиоксидантних молекул.

Рівень продуктів пероксидації також зменшувався у гострому періоді і надалі зростав. Таку динаміку встановлено щодо карбонільних груп і дієнових кон'югатів як при застосуванні суспензії ЖТ, так і ЧКМ, а рівень ТБК-активних продуктів у групі 4 і 5 навіть зростав. Тобто у віддалений період після застосування суспензії ЧКМ може виникати «агресивне» метаболічне мікрооточення, що пояснює причину вторинної дегенерації нервових волокон у дистальному сегменті нерва.

Серед функцій, які виконує глутатіон, в першу чергу слід відзначити його участь у захисті клітин від продуктів окисного стресу. Так, глутатіонпероксидаза (GPx; номенклатура ферментів: ЕС 1.11.1.9) за участі глутатіону відновлює перекис водню до води, відновлює органічні продукти гідропероксидації до відповідних спиртів.

Активація глутатіонзалежної антиоксидантної ферментної системи нейтралізує реакції ПОЛ і підтримує у відновленому стані SH-групи протеїнів, забезпечуючи цим їх функціональну активність. GPx – один з основних ферментів цієї системи, яка каталізує відновлення пероксиду водню та інших органічних

гідропероксидів до води і спиртів з одночасним окисненням відновленого глутатіону.

Різке збільшення активності цих ферментів у віддаленому періоді після аутопластики у групах 2-5 можна пояснити компенсаторними реакції, які спрямовані на відновлення антиоксидантної системи. При цьому найбільше збільшення показників було встановлено при комбінованому застосуванні суспензії клітин ЖТ і ЧКМ.

Активність каталази через 1 місяць після травми залишалась підвищеною, але через 3 місяці зменшувалась, а у групах 4 і 5 навіть була нижче контрольних значень. На противагу цьому активність ДТ-діафрази спершу зростала, але у наступний період не відрізнялась від групи 2.

Результати гістологічних та біохімічних досліджень засвідчили важливі дані структурно-метаболических змін у скелетних м'язах при травмі периферійного нерва. Встановлено, що навіть при успішній аутопластиці нерва розвиваються гіпотрофічні зміни, які з часом прогресують. Це має своє відображення на морфологічному та метаболическому рівнях, а за результатами їх оцінки можна прогнозувати динаміку та характер атрофії денервованих м'язів. В загальній динаміці гіпотрофія м'язів характеризується зменшенням кількості та об'єму м'язових волокон та одночасним збільшення відносної щільності стромальних елементів у м'язі. Ймовірно, травма нерва не обмежується денервацією м'язу і позначається на гемодинаміці у м'язі, скільки різке збільшення продуктів пероксидації відмічається при ішемії тканин. Різке збільшення рівня дієнових кон'югатів, МДА і карбонільних груп є наслідком окиснювального стресу у м'язових волокнах, а одночасне зменшення вільних SH-груп пояснюється їх нейтралізацією вказаними цитотоксичних метаболітів. При цьому активація глутатіон-залежних ферментів відбувається у віддаленому періоді, що пояснюється частковим відновленням пулу вільних SH-груп, де основну частку складає глутатіон. В цілому, ці дані вказують на різкі метаболическі перебудови у денервованих м'язах, які полягають у пероксидації ліпідних та білкових молекул з одночасним виснаженням антиоксидантних захисних механізмів.

Аналіз впливу суспензій клітин ЖТ на основі збагаченої тромбоцитами плазми і КМ засвідчив часткове запобігання прогресуючій атрофії денервованих м'язів на тлі стимуляції регенерації сідничого нерва. Відновні процеси у нерві в більшій мірі відбувалися при нанесенні клітин з КМ, але це мало позитивний вплив на ранніх строках, оскільки у віддаленому терміні спостереження регенерація супроводжувалась дегенеративними змінами в нерві та атрофією м'язових волокон. На основі аналізу біохімічних показників можна стверджувати, що суспензія клітин ЖТ у більшій мірі, ніж суспензія клітин КМ вплинула на метаболізм м'язів. На це вказує зменшення рівня карбонільних груп і активація GPx і GR у ранній період та менш виражена компенсаторна реакція цієї системи через 3 місяці після аутопластики. Вплив комбінації клітинних суспензій, очевидно, визначається дією клітин, отриманих з КМ, оскільки за біохімічними показниками суттєвої різниці між групами 4 і 5 не встановлено.

ВИСНОВКИ

1. В експерименті доведено позитивний вплив концентрованого аспірату кісткового мозку на регенерацію нерва при його пластиці. Його застосування дозволило пришвидшити регенерацію нерва в період 1 місяць після пластики та значно підвищити кількість аксонів що проросли на рівні дистального шва.
2. Доведено, що жирова тканина активує регенерацію нерва через ділянку аутопластики, але механізми дії дещо відрізняються від дії аспірату кісткового мозку. Аспірат кісткового мозку, зумовлюючи неоангіогенез в зоні застосування, в більшій мірі впливає на трофічні процеси. Так, активність DT-діафрази через 3 місяці в групі застосування кісткового мозку була в 3,3 рази вищою, ніж в контрольній групі (майже наближаючись до норми) в той час як при застосуванні жирової тканини її активність була лише в 1,2 рази вищою за контроль. Комбіноване застосування показало найкращі результати нормалізації біохімічних процесів та активації регенерації - через 1 та 3 місяці після пластики.
3. Через 3 місяці після пластики нерва в експерименті в групі де виконувалася лише пластика - спостерігалось проростання лише $49,7 \pm 2\%$ аксонів. В той час як в групі де застосовувалася жирова тканина та аспірат кісткового мозку кількість аксонів, що проросла, була вищою – $67,5 \pm 3\%$ та $64,2 \pm 2,5\%$ відповідно. В групі де застосовувалась суміш жирової тканини та аспірату кісткового мозку через 3 місяці відмічалось проростання $69,6 \pm 3\%$ аксонів.
4. Формування фіброзної тканини зумовлює ішемію в зоні пластики та зумовлює вторинну дегенерацію, що було особливо помітно в контрольній групі. При застосуванні жирової тканини спостерігалось формування менш щільного рубця в епіневрії з включеннями жирової тканини. В групі, де застосовувалася суміш жирової тканини та кісткового мозку, морфологічно

структура параневрального оточення найбільше відповідала здоровій тканині з відтворенням тканини ковзання.

5. В групі де виконувалася лише аутопластика - через 3 місяці спостерігалися значні денерваційні зміни – площа перерізу мязових волокон була $39\pm 3\%$, від неушкодженого нерва, в той час як в групі де застосовувалися жирова тканина та кістковий мозок- дорівнювала та навіть перевищувала рівень інтактної групи. Таким чином застосування клітинних технологій запобігає та значно зменшує ступінь денерваційних змін у м'язах та зберігає їх на період денервації до моменту реінервації.
6. Серією експериментальних досліджень доведено достовірний позитивний вплив жирової тканини як на регенерацію нерва через трансплатат так і на денерваційні процеси в м'язах, при цьому суміш жирової тканини та аспірату кісткового мозку показала вищу активність порівняно з ізольованим використанням, що дозволяє рекомендувати застосування суміші жирової тканини та аспірату кісткового мозку в клінічній практиці при реконструктивних операціях на нервах в тому числі при пластиці великих дефектів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 1984; Vol.105: 121-6.
2. Altmann C, Vasic V, Hardt S, Heidler J, Häussler A, Wittig I, et al. Progranulin promotes peripheral nerve regeneration and reinnervation: role of notch signaling. *Mol Neurodegener.* 2016; № 1 (11): 69.
3. Amoh Y, Hamada Y, Aki R, Kawahara K, Hoffman R.M, Katsuoka K. Direct transplantation of uncultured hair-follicle pluripotent stem (hfPS) cells promotes the recovery of peripheral nerve injury. *J Cell Biochem.* 2010; № 110 (110): 272-7.
4. Bastami F, Vares P, Khojasteh A. Healing Effects of Platelet-Rich Plasma on Peripheral Nerve Injuries. *J Craniofac Surg.* 2017 Jan;28(1):e49-e57.
5. Berthold CH edited by Waxman SG. The Axon: Structure, Function and Pathophysiology. New York: Raven Press; 1978. Chapter 2, Morphology of normal peripheral axons; p. 3-63.
6. Birch R. Surgical disorders of the peripheral nerves. Rolfe Birc: Springer; 2011. 645 p.
7. Boháč M, Csöbönyeiová M, Kupcová I, Zamborský R, Fedeleš J, Koller J. Stem cell regenerative potential for plastic and reconstructive surgery. *Cell Tissue Bank.* 2016; № 4 (17): 735-44.
8. Bozkurt A, Dunda SE, Mon O'Dey D, Brook GA, Suschek CV, Pallua N. Epineurial sheath tube (EST) technique: an experimental peripheral nerve repair model. *Neurol Res.* 201; № 10 (33): 1010-15.
9. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of Peripheral Nerve Injury: A Brief Review. *Neurosurg Focus.* 2004; № 5 (16): 11.
10. Chitose SI, Sato K, Fukahori M, Sueyoshi S, Kurita T, Umeno H. Recurrent laryngeal nerve regeneration using an oriented collagen scaffold containing Schwann cells. *Laryngoscope.* 2017 Jul;127(7):1622-27.
11. Cho HH, Jang S, Lee SC, Jeong HS, Park JS, Han JY, et al. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model. *Laryngoscope.* 2010; № 5 (120): 907-13.
12. Chung KC, Yang L J-S, McGillicuddy JE. Practical management of pediatric and adult brachial plexus palsies. USA: “Elsevier saunders”; 2012. 386p.
13. Da Silva JT, Santos FM, Giardini AC, Martins Dde O, de Oliveira ME, Ciena AP. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. *Growth Factors.* 2015; - № 1 (33): 8-13.

14. Dahlin LB, Rydevik B, McLean WG, Sjostrand J. Changes in fast axonal transport during experimental nerve compression at low pressures. *Exper. Neurol.* 1984; № 84: 29-36.
15. Dahlin LB, McLean WG. Effects of graded experimental compression on slow and fast axonal transport in rabbit vagus nerve. *J. Neurol. Sci.* 1986; № 72: 19-30.
16. Dahlin LB, Sjostrand J, McLean WG. Graded inhibition of retrograde axonal transport by compression of rabbit vagus nerve *J. Neurol. Sci.* 1986; № 76: 221-30.
17. Durandea A, Piton Ch, Fabre Th, Lasseur E, Andre D, Geneste M. Results of 14 nerve grafts of the common peroneal nerve after a severe valgus strain of the knee. *The journal of bone & joint surgery.* 1997; № 79-B: 54.
18. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; Vol. 82, № 1: 70-7.
19. Eren F, Öksüz S, Küçükodaci Z, Kendırlı MT, Cesur C, Alarçın E, et al. Targeted mesenchymal stem cell and vascular endothelial growth factor strategies for repair of nerve defects with nerve tissue implanted autogenous vein graft conduits *Microsurgery.* 2016; № 7 (36): 578-85.
20. Firat C, Aytakin AH, Durak MA, Geyik Y, Erbatur S, Dogan M, et al. Comparison of the effects of PRP and hyaluronic acid in promoting peripheral nerve regeneration An experimental study with vascular conduit model in rats. *Ann Ital Chir.* 2016; № 87: 362-74.
21. Fowler JR, Lavasani M, Huard J, Goitz RJ. Biologic strategies to improve nerve regeneration after peripheral nerve repair. *J Reconstr Microsurg.* 2015; № 4 (31): 243-8.
22. Fowler TJ, Ochoa J. Unmyelinated fibres in normal and compressed peripheral nerves of the baboon. A quantitative electron microscopic study. *Neuropathol. and Appl. Neurobiol.* 1975; - № 1: 247-65.
23. Frost HK, Kodama A, Ekström P, Dahlin LB. G-CSF prevents caspase 3 activation in Schwann cells after sciatic nerve transection, but does not improve nerve regeneration. *Neuroscience.* 2016; № 334: 55-63.
24. Fujimaki H, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Nemoto N, Saku T. Oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor promote peripheral nerve regeneration in a 15 mm sciatic nerve defect rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2016; № 1 (105): 8-14.
25. Gale KL, Rakha EA, Ball G, Tan VK, McCulley SJ, Macmillan RD. A Case-Controlled Study of the Oncologic Safety of Fat Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2015; № 5 (135): 1263-75.
26. Gan L, Zhao L, Zhao Y, Li K, Tong Z, Yi L, et al. Cellulose/soy protein composite-based nerve guidance conduits with designed microstructure for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng.* 2016; № 13: 5.

27. Gao M, Lu P, Lynam D, Bednark B, Campana WM, Sakamoto J, Tuszynski M. BDNF gene delivery within and beyond templated agarose multi-channel guidance scaffolds enhances peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng.* 2016; № 13: 6.
28. García-Pérez MM, Martínez-Rodríguez HG, López-Guerra GG, Soto-Domínguez A, Said-Fernández SL, Morales-Avalos R, et al. A modified chemical protocol of decellularization of rat sciatic nerve and its recellularization with mesenchymal differentiated schwann-like cells: morphological and functional assessments. *Histol Histopathol.* 2016; №32 (8):779-92.
29. Gaudin R, Knipfer C, Henningsen A, Smeets R, Heiland M, Hadlock T. Approaches to Peripheral Nerve Repair: Generations of Biomaterial Conduits Yielding to Replacing Autologous Nerve Grafts in Craniomaxillofacial Surgery. *Biomed Res Int.* 2016; № 2016: 18.
30. Gelberman RH, Hergenroeder PT, Hargens AR, Lundborg GN, Akeson WH. The carpal tunnel syndrome. A study of carpal canal pressures. *J. Bone and Joint Surg.* 1981; № 63-A: 380-3.
31. Gess B, Röhr D, Lange E, Halfter H, Young P. Desmoplakin is involved in organization of an adhesion complex in peripheral nerve regeneration after injury. *Exp Neurol.* 2015; № 264: 55-66.
32. Gilliatt RW edited by Sumner AJ, Saunders WB. *The Physiology of Peripheral Nerve Disease.* USA: W.B. Saunders Company; 1980. Acute compression block ; 287-315.
33. Gordon T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Commun Disord.* 2010; № 4 (43): 265-73.
34. Goulart CO, Ângelo Durço DF, de Carvalho LA, Oliveira JT, Alves L, et al. Olfactory ensheathing glia cell therapy and tubular conduit enhance nerve regeneration after mouse sciatic nerve transection. *Brain Res.* 2016; № 1650: 243-51.
35. Gupta MK, Ajay AK. Fat on sale: role of adipose-derived stem cells as anti-fibrosis agent in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy.* 2015; № 6 (233):2.
36. Harris GM, Madigan NN, Lancaster KZ, Enquist LW, Windebank AJ, Schwartz J, et al. Nerve Guidance by a Decellularized Fibroblast Extracellular Matrix. *Matrix Biol.* 2016 Jul; 60-61: 176-189
37. Hellenbrand DJ, Kaeppler KE, Ehlers ME, Thompson CD, Zurko JC, Buchholz MM, et al. Immunohistochemical assessment of rat nerve isografts and immunosuppressed allografts. *Neurol Res.* 2016; № 12 (38): 1094-101.
38. Helvacioğlu F, Kandemir E, Karabacak B, Karataş I, Peçen A, Ercan I, et al. Effect of Creatine on Rat Sciatic Nerve Injury: A Comparative Ultrastructural Study. *Turk Neurosurg.* 2018;28(1):128-136.

39. Hernández-Cortés P, Toledo-Romero MA, Delgado M, Gonzalez-Rey E, Gómez Sánchez R, Prados N, et al. Ghrelin and adipose-derived mesenchymal stromal cells improve nerve regeneration in a rat model of epsilon-caprolactone conduit reconstruction. *Histol Histopathol.* 2017 Jun;32(6):627-37.
40. Hogendoorn S, Duijnisveld BJ, van Duinen SG, Stoel BC, van Dijk JG, Fibbe WE, et al. Local injection of autologous bone marrow cells to regenerate muscle in patients with traumatic brachial plexus injury. *Bone & Joint Research.* 2014; № 2 (3): 38-47.
41. Hu Y, Wu Y, Gou Z, Tao J, Zhang J, Liu Q, et al. 3D-engineering of Cellularized Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Sci Rep.* 2016; № 6:6
42. Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016; № 17: 9.
43. Jung N, Park S, Choi Y, Park JW, Hong YB, Park HH, et al. Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiate into a Schwann Cell Phenotype and Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016; № 17: 11.
44. Kim DY, Choi YS, Kim SE, Lee JH, Kim SM, Kim YJ, et al. In vivo effects of adipose-derived stem cells in inducing neuronal regeneration in Sprague-Dawley rats undergoing nerve defect bridged with polycaprolactone nanotubes. *J Korean Med Sci.* 2014; № 3: 183-92.
45. Kiryu-Seo S, Kiyama H. The nuclear events guiding successful nerve regeneration. *Front Mol Neurosci.* 2011; № 4: 53.
46. Kline D.G. Surgical repair of brachial plexus injury. *J. Neurosurg.* 2004; № 101: 361-4.
47. Kohn C, Klemens JM, Kascholke C, Murthy NS, Kohn J, Brandenburger M, et al. Dual-component collagenous peptide/reactive oligomer hydrogels as potential nerve guidance materials - from characterization to functionalization. *Biomater Sci.* 2016; № 4 (11): 1605-21.
48. Law V, Dong S, Rosales JL, Jeong MY, Zochodne D, Lee KY. Enhancement of Peripheral Nerve Regrowth by the Purine Nucleoside Analog and Cell Cycle Inhibitor, Roscovitine. *Front Cell Neurosci.* 2016; № 10: 238.
49. Lee DC, Chen JH, Hsu TY, Chang LH, Chang H, Chi YH. Neural Stem Cells Promote Nerve Regeneration through IL12-induced Schwann cell Differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 2017 Mar;79:1-11
50. Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy.* 2015; № 6 (55): 13.

51. Lin YC, Ramadan M, Van Dyke M, Kokai LE, Philips BJ, Rubin JP, et al. Keratin gel filler for peripheral nerve repair in a rodent sciatic nerve injury model. *Plast Reconstr Surg.* 2012; № 1 (129): 67-78.
52. Liu GM, Xu K, Li J, Luo YG. Curcumin upregulates S100 expression and improves regeneration of the sciatic nerve following its complete amputation in mice. *Neural Regen Res.* 2016; № 11 (8): 1304-11.
53. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; № 1 (193): 265-75.
54. Ma T, Zhu L, Yang Y, Quan X, Huang L, Liu Z, et al. Enhanced in vivo survival of Schwann cells by a synthetic oxygen carrier promotes sciatic nerve regeneration and functional recovery. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan;12(1):e177-e89
55. Madduri S, Gander B. Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves . *J Control Release.* 2012; № 2 (161): 274-82.
56. McLellan D.L. Longitudinal sliding of median nerve during hand movements: A contributory factor in entrapment neuropathy? *Lancet.* 1975; № 1: 633-34.
57. McLellan DL, Swash M. Longitudinal sliding of the median nerve during movements of the upper limb. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1976; № 39: 566-70.
58. Mirsa HP, Fredovich Y. The role of super oxide anion in the antioxidation of epinefrine and simple assay for superoxide dismutase. *IAMA.* 1972; № 247(10): 3170-75.
59. Mohammadi J, Delaviz H, Mohammadi B, Delaviz H , Rad P. Comparison of repair of peripheral nerve transection in predegenerated muscle with and without a vein graft. *BMC Neurol.* 2016; № 1 (16): 237.
60. Nawrotek K, Tylman M, Rudnicka K, Gatkowska J, Wieczorek M. Epineurium-mimicking chitosan conduits for peripheral nervous tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2016; № 152: 119-28.
61. Nazzi V, Cordella R, Messina G, Dones I, Franzini A. Role of intra-operative neurophysiologic monitoring during decompression and neurolysis after peripheral nerve injury: case report. *Somatosens Mot Res.* 2012; № 29 (4):117-21.
62. Ni HC, Tseng TC, Chen JR, Hsu SH, Chiu IM. Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap. *Biofabrication.* – 2013;№ 3 (5): 035010.
63. Nobakhti-Afshar A, Najafpour A, Mohammadi R, Zarei L. Assessment of Neuroprotective Effects of Local Administration of 17-Beta-Estradiol on Peripheral Nerve Regeneration in Ovariectomized Female Rats. *Bull Emerg Trauma.* 2016; № 4(3):141-9.
64. Ochoa J, Fowler TJ, Gilliat RW. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J. Anat.* – 1972; № 113: 433-55.

65. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Clin. Med.* 1967; № 70:158-69.
66. Panagopoulos G.N. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration / Panagopoulos G.N., Megaloikonomos P.D., Mavrogenis A.F. // *Orthopedics.* - 2016. - C. 1-16.
67. Petrova GV, Donchenko GV. Cytotoxicity of troglitazone, a structural analogue of α -tocopherol is mediated by inhibition of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2009; №81(4): 82-8.
68. Pinho AC, Fonseca AC, Serra AC, Santos JD, Coelho JF. Peripheral Nerve Regeneration: Current Status and New Strategies Using Polymeric Materials. *Adv Healthc Mater.* 2016; № 5 (21): 2732-44.
69. Pita-Thomas W, Barroso-García G, Moral V, Hackett AR, Cavalli V, Nieto-Diaz M. Identification of axon growth promoters in the secretome of the deer antler velvet. *Neuroscience.* 2016; № 340: 333-44.
70. Rydevik B, Nordberg C. Changes in nerve function and nerve fibre structure induced by acute, graded compression. *J. Neurol., Neurosurg. and Psychiat.* 1980; № 43: 1070-82.
71. Sánchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Prado R, Orive G, et al. Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2016; № 1: 16.
72. Santos D, Gonzalez-Perez F, Navarro X, Del Valle J. Dose-Dependent Differential Effect of Neurotrophic Factors on In Vitro and In Vivo Regeneration of Motor and Sensory Neurons. *Neural Plast.* 2016; № 2016.
73. Schuh CM, Monforte X, Hacketh J, Redl H, Teuschl AH. Covalent binding of placental derived proteins to silk fibroin improves schwann cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; № 27(12): 188.
74. Seddon H.J. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; № 66: 237-88.
75. Şenses F, Önder ME, Koçyiğit ID, Kul O, Aydın G, Inal E, et al. Effect of Platelet-Rich Fibrin on Peripheral Nerve Regeneration. *J Craniofac Surg.* 2016; № 7 (27): 1759-64.
76. Song J, Sun B, Liu S, Chen W, Zhang Y, Wang C, et al. Polymerizing Pyrrole Coated Poly (l-lactic acid-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) Conductive Nanofibrous Conduit Combined with Electric Stimulation for Long-Range Peripheral Nerve Regeneration. *Front Mol Neurosci.* 2016; № 9:117.
77. Strong AL, Cederna PS, Rubin JP, Coleman SR, Levi B. The Current State of Fat Grafting: A Review of Harvesting, Processing, and Injection Techniques. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2015; № 4 (136): 897-912.

78. Sunderland S. *Nerves and Nerve Injuries*, ed 2. New York: Churchill Livingstone; 1978.1046
79. Tobita M, Tajima S, Mizuno H. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: stem cell transplantation methods that enhance stemness. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; № 6 (215):7.
80. Tseng KC, Li H, Clark A, Sundem L, Zuscik M, Noble M, et al. 4-Aminopyridine promotes functional recovery and remyelination in acute peripheral nerve injury. *EMBO Mol Med*. 2016 Dec; 8(12): 1409–20.
81. Tuncel U, Kostakoglu N, Turan A, Cevik B, Cayli S, Demir O, et al. The Effect of Autologous Fat Graft with Different Surgical Repair Methods on Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Defect Model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015; № 6 (136):1181-91.
82. Twiss JL, Kalinski AL, Sachdeva R, Houle JD. Intra-axonal protein synthesis - a new target for neural repair? *Neural Regen Res*. 2016; № 9 (11):1365-67.
83. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem*.1978; № 1 (86): 271-78.
84. Usach V, Malet M, López M, Lavallo L, Piñero G, Saccoliti M, et al. Systemic transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes axonal regeneration and analgesia in a model of Wallerian degeneration. *Transplantation*. 2017 Jul;101(7):1573-86
85. Uz M, Sharma AD, Adhikari P, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. Development of multifunctional films for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater*. 2017;56:141-52.
86. Visser PhA, Hermreck AS, Pierce GE, Thomas JH, Hardin CA. Prognosis of Nerve Injuring incurred during acute trauma to peripheral arteries. *Am. J. Surg*. 1980; №1 (140): 596-9.
87. Wakimura Y, Wang W, Itoh S, Okazaki M, Takakuda K. An Experimental Study to Bridge a Nerve Gap with a Decellularized Allogeneic Nerve. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015; № 3 (136): 319e-27e.
88. Waller A. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. 1850;140: 423-9.
89. Walmsley GG, Maan ZN, Wong VW, Duscher D, Hu MS, Zielins ER. Scarless Wound Healing: Chasing the Holy Grail. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015; № 3 (135): 907-17.
90. Walsh S, Midha R. Use of stem cells to augment nerve injury repair. *Neurosurgery*. 2009; № 4. (65): 80-6.
91. Wang W, Itoh S, Yamamoto N, Okawa A, Nagai A, Yamashita K. Enhancement of nerve regeneration along a chitosan nanofiber mesh tube on which electrically

- polarized beta-tricalcium phosphate particles are immobilized. *Acta Biomater.* 2010; № 6(10): 4027-33.
92. Wang W, Huang CY, Tsai FJ, Tsai CC, Yao CH, Chen YS. Growth-promoting effects of quercetin on peripheral nerves in rats. *Int J Artif Organs.* 2011; № 11 (34): 1095-105.
 93. Wang Y, Li WY, Jia H, Zhai FG, Qu WR, Cheng YX, et al. KLF7-transfected Schwann cell graft transplantation promotes sciatic nerve regeneration. *Neuroscience.* 2016; № 340: 319-32.
 94. Wang Y, Jia H, Li WY, Guan LX, Deng L, Liu YC, et al. Molecular examination of bone marrow stromal cells and chondroitinase ABC-assisted acellular nerve allograft for peripheral nerve regeneration. *Exp Ther Med.* 2016; № 4 (12):1980-92.
 95. Weaver FA, Papanicolaou G, Yellin AE. Difficult peripheral vascular injuries. *Surgical Clinics of North America.* 1996; №4 (76): 843-59.
 96. Weiss T, Taschner-Mandl S, Bileck A, Slany A, Kromp F, Rifatbegovic F, et al. Proteomics and transcriptomics of peripheral nerve tissue and cells unravel new aspects of the human Schwann cell repair phenotype. *Glia.* 2016; № 12 (64): 2133-53.
 97. White JD, Wang S, Weiss AS, Kaplan DL. Silk-tropoelastin protein films for nerve guidance. *Acta Biomater.* 2015; № 14:1-10.
 98. Wilgis EF, Murphy R. The significance of longitudinal excursion in peripheral nerves. *Hand Clin.* 1986; № 2: 761-71.
 99. Willand MP, Rosa E, Michalski B, Zhang JJ, Gordon T, Fahnstock M. Electrical muscle stimulation elevates intramuscular BDNF and GDNF mRNA following peripheral nerve injury and repair in rats. *Neuroscience.* 2016; № 334: 93-104.
 100. Wu W, Zhang S, Chen Y, Liu H. Biological function and mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells-packed poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) scaffolds for peripheral nerve injury: the involvement of miR-21-Notch signaling pathway. *Curr Neurovasc Res.* 2017;14(1):19-25.
 101. Xiao B, Rao F, Guo ZY, Sun X, Wang YG, Liu SY, et al. Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res.* 2016; № 7 (11): 1172-9.
 102. Xu F, Zhang K, Lv P, Lu R, Zheng L, Zhao J. NECL1 coated PLGA as favorable conduits for repair of injured peripheral nerve. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; № 70:1132-40.
 103. Yang X, Chen J, Xue P, Liu R, Ji W, Lu X, et al. Differentiation of bone marrow stromal cells into schwann-like cells using dihydrotestosterone combined with a classical induction method. *Biotechnol Lett.* 2017 Feb;39(2):331-337. doi: 10.1007/s10529-016-2239-4. Epub 2016 Oct 26.

104. Yao L, de Ruiters GC, Wang H, Knight AM, Spinner RJ, Yaszemski MJ, et al. Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit. *Biomaterials*. 2010; № 31 (22):5789-97.
105. Yoshikawa H, Yamada Y, Kurose M, Yamamura K, Maeda T, Seo K. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Regeneration Following Inferior Alveolar Nerve Injury in Rats. *J Oral Facial Pain Headache*. 2016; № 4 (30): 346-54.
106. Yu T, Zhao C, Li P, Liu G, Luo M. Poly(lactic-co-glycolic acid) conduit for repair of injured sciatic nerve: A mechanical analysis. *Neural Regen Res*. 2013; № 8 (21): 1966-73.
107. Yuan W, Feng X. Immune cell distribution and immunoglobulin levels change following sciatic nerve injury in a rat model. *Iran J Basic Med Sci*. 2016; № 7 (19): 794-9.
108. Yue Y, Yang X, Zhang L, Xiao X, Nabar NR, Lin Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound upregulates pro-myelination indicators of Schwann cells enhanced by co-culture with adipose-derived stem cells. *Cell Prolif*. 2016; № 6 (49): 720-8.
109. Zaytseva OV, Shandrenko SG. Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups. *Ukr. Biokhim. Zhurn*. 2012; № 84(5): 112-6.
110. Zha GB, Shen M, Gu XS, Yi S. Changes in microtubule-associated protein tau during peripheral nerve injury and regeneration. *Neural Regen Res*. 2016; № 11 (9): 1506-11.
111. Zhang C, Lv G. Repair of sciatic nerve defects using tissue engineered nerves. *Neural Regen Res*. 2013; № 8 (21): 1985-994.
112. Zhang XF, Liu HX, Ortiz LS, Xiao ZD, Huang NP. Laminin-modified and aligned PHBV/PEO nanofibrous nerve conduits promote peripheral nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Jan;12(1):e627-e636. doi: 10.1002/term.2355. Epub 2017 Apr 9
113. Zhou X, Yang A, Huang Z, Yin G, Pu X, Jin J. Enhancement of neurite adhesion, alignment and elongation on conductive polypyrrole-poly(lactide acid) fibers with cell-derived extracellular matrix. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016; № 149: 217-25.
114. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. 2001; № 7(2): 211-28.
115. Абдулкина Н.Г. Алгоритмизация физиотерапии травм периферических нервов / Абдулкина Н.Г., Левицкий Е.Ф., Кочегуров В.А. // Томск: Изд-во "Печатная мануфактура". - 2007. - С. 248.

- 116.Балезина ОП, Герасименко НЮ, Дугина ТН, Струкова СМ. Исследование нейротрофической активности тромбина на модели регенерирующего нерва мышцы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005; № 1 (139): 8-10.
- 117.Берснев ВП, Кокин ГС. Хирургия нервов нижних конечностей. Травматология и ортопедия. 2006; № 3: 862-84.
- 118.Борзых АВ, Кравченко АВ. Лечение последствий травм верхней конечности с использованием сухожильно - мышечных транспозиций. Вісник ортопедії, травматології та протезування. 2007; № 1: 72-4.
- 119.Валерко В.Г. Ошибки и трудности хирургического лечения поврежденных периферических нервов верхних конечностей. [Дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. Наук]. С.-Пб; 2006. 154 с.
- 120.Ворона Ю.С. Применение мембран аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, с целью направленной регенерации тканей в области глоточных швов после операций на гортани, глотке и полости рта [Дис канд. мед. Наук]. Курск; 2014. - С. 143.
- 121.Гаврилов ВБ, Гаврилова АР, Хмара НФ. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. Лабор. дело. 1988; № 2: 60-3.
- 122.Гайович ІВ, Страфун СС, Гайович ВВ, Борзих НО, Савосько СІ. Вплив суспензії жирової тканини на відновлення периферійного нерва після аутопластики дефекту. Вісник ортопедії, травматології та протезування. 2015; №4: 46-50.
- 123.Гайович ІВ, Страфун СС, Гайович ВВ, Борзих НО, Савосько СІ. Вплив трансплантації концентрованої суспензії червоного кісткового мозку на структурно-функціональне відновлення сідничного нерва після аутопластики. Літопис травматології та ортопедії. 2016; №1-2: 96-102.
- 124.Гайович ІВ., Борзих НО. Застосування жироплазмотромбоцитарної тканинної суміші у регенерації травматично ушкодженого периферійного нерва. Травма. 2016; №2 (17): 73-7.
- 125.Гайович ІВ, Савосько СІ. Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження). Травма. 2018; №2 (19): 51-61.
- 126.Гайович ІВ, Гайович ВВ, Макаренко ОМ, Савосько СІ. Нейрометаболичні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва. Вісник морської медицини. 2018; №1 (78): 74-84.

127. Гайович І.В. Досвід використання аутологічних клітинних технологій при відновленні периферичних нервів / Страфун С.С., Гайович В.В., Савосько С.І. В: Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Травматичні ушкодження центральної та периферичної нервової системи». Кам'янець-Подільський, Програма, Тези доповідей; 2016 вер 15-16; Кам'янець-Подільський, Україна. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2016. с. 71.
128. Гайович І.В. Пластика дефектів нервів з застосуванням аспірату кісткового мозку та жирової тканини В: Конференція молодих вчених ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України». Київ, програма, матеріали конференції. Літопис травматології та ортопедії – 2017 №1-2 с.184
129. Гришин И.Г. Микрохирургия в травматологии и ортопедии: достижения, нерешенные вопросы и перспективы. *Анналы травматологии и ортопедии.* 1993; №1: 23-8.
130. Деринская ЕВ, Ревин ВВ, Юданов МА. Регенерация поврежденного седалищного нерва крысы при действии стимулятора роста. *Фундаментальные исследования.* 2007; № 1: 38-9.
131. Дольницький ОВ, Дольницький ЮО. Атлас микрохирургических операций на периферических нервах: [Практ. руководство]. Киев «Выща школа»; 1991: 182
132. Дыбан АП, Дыбан ПА. Стволовые клетки и экспериментальной и клинической медицине. *Мед. акад. журн.* 2002; № 2 (3): 3-24.
133. Кончугова ТВ, Бобровницкий ИП, Орехова ЭМ, Пузырева ГА. Перспективы развития регенеративной физиотерапии. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.* 2014; № 5 (91): 42-9.
134. Лукаш ЛЛ, Василевская СВ. Стволовые клетки млекопитающих *in vitro*, как основа новых биотехнологий. *Биополимеры и медицина.* 2001; № 3 (17): 203-11.
135. Луцик ОД, Иванова АЙ, Кабак КС, Чайковский ЮБ. Гістологія людини. Київ: «Книга плюс»; 2003. 592.
136. Масгутов РФ, Ризванов АА, Богов АА (мл), Галлямов АР, Киясов АП, Богов АА. Современные тенденции лечения повреждений периферических нервов. *Практическая медицина.* 2013; № 1-2 (69): 99-103.
137. Масгутов РФ, Салафутдинов ИИ, Богов АА (мл), Трофимова АА, Ханнанова ИГ, Муслин Ри, та ін. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста

- фибробластов. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011; № 3 (6): 67-70.
138. Михайлузов Р.Н. Факторы роста - перспективные технологии воздействия на раневой процесс. Харківська хірургічна школа. 2014; № 5 (68): 90-8.
139. Науменко ЛЮ, Доманский АН, Шпонька ВИ. Морфологическая оценка влияния нейрорафии с миотизацией анастомоза на регенерацию периферического нерва в эксперименте. Морфологія. 2010; №1 (4): 26-32.
140. Никитенко ВИ, Павловичев СА, Полякова ВС, Никитенко ВИ, [и др.]. Использование факторов роста фибробластов для лечения ран и ожогов. Хирургия. 2012; № 12: 72-6.
141. Николаев СИ, Галлямов АР, Чельшев ЮА. Локальная доставка генов VEGF и FGF2, стимулирующая регенерацию нерва. Астраханский медицинский журнал. 2013; № 1 (8): 170-4.
142. Петрова Е.С. Восстановление поврежденного нерва с помощью клеточной терапии (фундаментальные аспекты). Acta Nature. 2015; № 3 (26): 42-53.
143. Петрова ЕС. Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва. Цитология. 2012; № 7 (54): 525-40.
144. Петрова ЕС, Павлова НВ, Коржевский ДЭ. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников. Медицинский академический журнал. 2012; № 3 (12): 15-29.
145. Петрова ЕС, Исаева ЕН, Коржевский ДЭ. Холинергические нейроны в суспензионных трансплантатах эмбрионального спинного мозга крысы, развивающихся в периферическом нерве взрослых животных. Вопросы морфологии XXI века. 2012:151-153.
146. Салафутдинов ИИ, Масгутов РФ, Богов АА, Ризванов АА, Ханнанова ИГ, Муллин РИ, та ін. Стволовые клетки и регенеративная медицина. М: Махс-пресс; 2012. Терапевтический потенциал клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при регенерации дефектов периферических нервов; 70-1.
147. Салафутдинов ИИ, Шафигуллина АК, Ялвач МЭ. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVES. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010; № 5 (2): 62-7.
148. Сидорович РР. Транспозиция большой грудной мышцы при травматическом повреждении верхнего отдела плечевого сплетения. Актуальные проблемы неврологии и нейрохирургии. 2003; № 5: 131-6.

149. Сотникова ЕП, Салдан ВИ, Фесюнова ГС. Традиционные основы тканевой терапии и перспективы развития. Экспериментальная и клиническая медицина. 2007; № 1: 15-9.
150. Трактуев ДО, Парфенова ЕВ, Ткачук ВА, Марч КЛ. Стромальные клетки жировой ткани - пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом. Цитология. 2006; № 2 (48): 83-94.
151. Фомина ГА, Масгутов РФ, Штырлин ВГ, Зявкина ЮИ, Чельшев ЮА. Гидрогелевый матрикс на основе биосовместимых карбомеров для восполнения дефектов нервной ткани. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007; № 4 (2): 63-7.
152. Ходулев ВИ, Пономарев ВВ. Электронейромиографические методы исследования лучевого нерва. Достижения медицинской науки Беларуси. – 2004; № 9: 30-1.
153. Худяев АТ, Мартель ИИ, Самылов ВВ, Мещерягина ИА, Россик ОС. Малоинвазивные методы лечения повреждений периферических нервов. Гений Ортопедии. 2012; № 1: 85-8.
154. Царёв АА, Кошарный ВВ. Структурные изменения сосудисто-нервного пучка поперечно-полосатой мускулатуры конечностей при повреждении периферических нервов. Вісник проблем біології і медицини. 2012; № 2 (93): 9-15.
155. Чекалина Е.Н. Роль тромбоцитарного концентрата в восстановлении и регенерации тканей. Дентал Юг. 2005; № 3(32): 23.
156. Чельшев ЮА, Мухамедшина ЯО, Шаймарданова ГФ, Николаев СИ. Прямая доставка терапевтических генов для стимулирования посттравматической нейрорегенерации. Неврологический вестник. 2012; № 1 (44): 76-83.
157. Чельшев ЮА Под ред. Данилова РК. Регенерация в нервной системе. Руководство по гистологии. СПб: СпецЛит; 2011. Т.1. С. 656-665.

ДОДАТОК А



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122507** (13) **U**
(51) МПК
A61B 17/56 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 08028**
(22) Дата подання заявки: **01.08.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.01.2018**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.01.2018, Бюл.№ 1**

(72) Винахідник(и):
**Гайович Василь Васильович (UA),
Гайович Ігор Володимирович (UA)**
(73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ТРАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ",
вул. Бульварно-Кудрявська, 27, м. Київ,
01601 (UA)**

(54) СПОСІБ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ПОШКОДЖЕНЬ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА

(57) Реферат:

Спосіб хірургічного лікування пошкоджень периферичного нерва включає відновлення цілісності пошкодженого нерва за допомогою мікрохірургічного втручання. Додатково в ділянку відновлення нерва інтраопераційно вводять суспензію жирової тканини та аспірату кісткового мозку, стабілізуючи її аутотромбіном.

UA 122507 U

ДОДАТОК Б
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гайович І.В. Вплив суспензії жирової тканини на відновлення периферійного нерва після аутопластики дефекту / Гайович І.В., Страфун С.С., Гайович В.В., Борзих Н.О., Савосько С.І. // Вісник ортопедії, травматології та протезування. - 2015. - №4. - С. 46-50.
2. Гайович І.В. Вплив трансплантації концентрованої суспензії червоного кісткового мозку на структурно-функціональне відновлення сідничного нерва після аутопластики / Гайович І.В., Страфун С.С., Гайович В.В., Борзих Н.О., Савосько С.І. // Літопис травматології та ортопедії. - 2016. - №1-2. - С. 96-102.
3. Гайович І.В. Застосування жироплазмотромбоцитарної тканинної суміші у регенерації травматично ушкодженого периферійного нерва / Гайович І.В., Борзих Н.О. // Травма. - 2016 - №2 (17). - С. 73-77.
4. Гайович І.В. Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження) / Гайович І.В., Савосько С.І. // Травма. - 2018 - №2 (19). - С. 51-61.
5. Гайович І.В. Нейрометаболичні зміни периферійного нерва та м'язів при їх травматичному ушкодженні та вплив аутологічної жирової тканини на репаративно-відновні процеси при пластиці нерва / Гайович І.В., Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. // Вісник морської медицини. - 2018. - №1 (78). - С. 74-84.
6. Гайович І.В. Досвід використання аутологічних клітинних технологій при відновленні периферичних нервів / Страфун С.С., Гайович В.В., Савосько С.І. В: Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Травматичні ушкодження центральної та периферичної нервової системи». Кам'янець-Подільський, Програма, Тези доповідей; 2016 вер 15-16; Кам'янець-Подільський, Україна. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2016. с. 71. Очна участь, виступ із доповіддю.
7. Гайович І.В. Пластика дефектів нервів з застосуванням аспірату кісткового мозку та жирової тканини В: Конференція молодих вчених ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України». Київ, програма, матеріали

- конференції. Літопис травматології та ортопедій; 2017 17 лютого; №1-2 с.184. Очна участь, виступ із доповіддю.
8. Gaiovych I., Strafun S., Gaiovych V. Using of bone marrow and fat to improve nerve regeneration after autoplasic. In: 6th Vienna Symposium on Surgery of Peripheral Nerves, Present state of Peripheral Nerve Surgery and New Ideas to Improve the Result;. 2017 March 17-19; General Hospital Lecture Halls, Vienna, Austria. Organiser: Millesi Center Vienna: P15 Очна участь, виступ із доповіддю.
 9. Гайович І.В. Страфун С.С. Використання сучасних клітинних технологій в лікуванні ушкоджень периферичних нервів. Матеріали міжнародного симпозіуму по реконструкції нервів, неврології та реабілітації. «Реконструкція периферичних нервів після тяжких ушкоджень»; 2016 19-20 травня; Київ, Україна: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. Очна участь, виступ із доповіддю.
 10. Гайович І.В. Страфун С.С. Клітинні технології в сучасній ортопедії та травматології. Матеріали міжнародної конференції «Регенеративні технології в сучасній медицині»; 2017 25-26 травня; Одеса, Україн: Міністерство охорони здоров'я України. Всеукраїнська асоціація пластичних реконструктивних і естетичних хірургів. 2017 Очна участь, виступ із доповіддю.
 11. Гайович І.В. «Аутопластика дефектів нервів з застосуванням жирової тканини та пунктату кісткового мозку». (експериментальне дослідження). Матеріали засідання вченої ради ІТО НАМН України. 2018 26 червня; ДУ ІТО НАМН України. Очна участь, виступ із доповіддю.
 12. Гайович І.В. ГАйович В.В; ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України", патентовласник. Спосіб хірургічного лікування пошкоджень периферичного нерва. Патент України на корисну модель №122507.10.01.2018