

Гайович І.В.<sup>1</sup>, Савосько С.І.<sup>2</sup><sup>1</sup>ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ, Україна<sup>2</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

## Віддалені результати впливу клітинних технологій на регенерацію сідничного нерва при пластиці великого дефекту (експериментальне дослідження)

**Резюме. Актуальність.** Автопластика при ушкодженні нерва не завжди призводить до задовільних результатів. Особливо це важливо враховувати при великих ушкодженнях нервів (більше 10 см), коли за час проростання аксонів до місця дистального шва відбувається фіброз зони дистального шва, що унеможливує подальшу регенерацію нерва та призводить до незадовільних функціональних результатів. Метою дослідження було дослідити вплив аспірату кісткового мозку та суспензії жирової тканини на регенерацію нервів за умови пластики великих дефектів. **Матеріали та методи.** Експерименти проведені на 25 статевозрілих кролях. Тварини були розподілені на 5 експериментальних груп: 2 контрольні (у 1-й нерв залишався неушкодженим, у 2-й виконувалася лише автопластика дефекту), у 3-й групі застосовувалися автопластика нерва і трансплантація жирової тканини, у 4-й — пластика нерва із використанням суспензії кісткового мозку, у 5 — пластика нерва з комбінованим застосуванням клітинних суспензій. **Результати.** Через 1 та 3 місяці тварин виводили з експерименту та зразки досліджувалися гістологічно та морфометрично. Морфометричний аналіз через 1 місяць показав, що проростання аксонів через дистальний шов спостерігалось лише в групах, в яких застосовувався аспірат кісткового мозку, через 3 місяці в контрольній групі частка аксонів, що проросли, становила 49,7 %, в дослідних групах вона була значно вищою — до 64 % у групі, де застосовувалася комбінація жирової тканини й аспірату кісткового мозку. Біохімічні показники, такі як DT-діафороза, рівень дієнових кон'югатів, ТБА-активних продуктів, через 3 місяці були ближчими до норми в групах використання клітинної технології. **Висновки.** У результаті досліджень встановлено вірогідний позитивний вплив застосування клітинних технологій на регенерацію нерва, як на морфологічну структуру, так і на біохімічні процеси. Найкращі результати отримані в групі застосування комбінації аспірату кісткового мозку та жирової тканини.

**Ключові слова:** регенерація; ушкодження нерва; аспірат кісткового мозку; жирова тканина

### Вступ

На сьогодні автопластика великих дефектів нерва є стандартом хірургічного відновлення застарілих ушкоджень периферійного нерва. У літературі накопичилася велика кількість даних про оцінку різних способів автопластики, ефективність відновлення нерва та м'язів кінцівки. Разом із тим вдало проведена автопластика нерва не завжди дає бажаний результат, що спонукає дослідників до пошуку різних стимулюючих засобів. Насамперед сфера наукових пошуків була спрямована на використання тканинних факторів росту, арсенал яких є досить широким і на сьогодні достатньо

дослідженим, а стимулюючий вплив щодо регенерації тканин — доведеним [5, 12]. Проте технологічне отримання факторів росту людини (human growth factor) та фармакоеконічні труднощі є перешкодою для їх широкого використання. Тому одним із напрямів стимуляції відновлення нерва стала розробка аутологічних продуктів, що містять стимулюючі біологічні фактори і сприяють процесам регенерації (Pompilio). Використання аутологічних продуктів швидко розширило можливості хірургії в маніпулюванні факторами росту і секреторними білками з метою поліпшення загоєння кісток, сухожилків і м'язів тканин. Клінічне застосу-

вання 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 робіт.

На сьогодні як такі аутологічні продукти відносно широкого застосування набули аутологічна тромбоцитарна плазма, суспензія мезенхімальних клітин жирової тканини і червоного кісткового мозку (Farouk). 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- $\beta$  та ін.). 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 згортка та вивільнення факторів росту.

Використання підготовленої суспензії клітин червоного кісткового мозку також сприяло регенерації ушкоджених тканин. Як зазначають автори, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку є потенціалом для мультилінійної диференціації. Разом із тим є дані про низькі показники виживання й онкогенність імплантованих мезенхімальних стовбурів клітини кісткового мозку, що може підірвати ефективність клітинної терапії. Використання додаткового мікросередовища, яким може бути аутологічна тромбоцитарна плазма, можливо, дасть змогу подолати ці обмеження. З огляду на це метою даного дослідження було підтвердити ефект аутологічної тромбоцитарної плазми, суспензії клітин червоного кісткового мозку та їх комбінованого нанесення на процеси регенерації травмованого сідничного нерва та метаболічної підтримки денервованих м'язів гомілки.

## Матеріали та методи

Експерименти проведені на 25 статевозрілих кролях вагою 3,2–3,5 кг. Тварини були розподілені на 5 груп: 1-ша — контрольна група (без ушкодження сідничного нерва); 2-га — дослідна група (пластика сідничного нерва); 3-тя — група, в якій використані автопластика нерва і трансплантація жирової тканини (ЖТ); 4-та — пластика нерва із застосуванням суспензії червоного кісткового мозку (ЧКМ); 5-та — пластика нерва з комбінованим використанням клітинних суспензій.

Премедикацію та знеболювання дослідних тварин здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (і.р., 60 мг/кг). 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 [16]. Тваринам наносили дефект нерва. Висікали фрагмент сідничного нерва довжиною 1 см та здійснювали пластику виділенням сегментом нерва. У 3-й групі забір 1 мл жирової клітковини здійснювали з ділянки великого сальника через 1 см доступу до черевної порожнини. Після цього забрану жирову тканину подрібнювали та гомогенізували шляхом 10-кратного пропускання через 1-мл канюлю. До жирової тканини додавали 1 мл аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми, що отримували з 5 мл венозної крові шляхом центрифугування мозку з цитратом декстрази (1 : 8) 16 хв при 740 g, та здійснювали забір 1 мл шару плазми, багатої тромбоцитами над еритроцитарною масою, після чого додавали 0,1 мл бичачого тромбіну для утворення суспензії жирової тканини та збагаченої тромбоцитами плазми.

У 4-й групі забір 2 мл аспірату кісткового мозку здійснювали голкою з троакаром із проксимального відділу стегна (ділянки великого вертлюга). Після цього аспірат кісткового мозку з цитратом декстрази (1 : 8) центрифугували 16 хв при 740 g та здійснювали забір 1 мл шару плазми над еритроцитарною масою, додавали 0,1 мл бичачого тромбіну для утворення суспензії аспірату кісткового мозку.

У 5-й групі отриману жирову тканину змішували не зі збагаченою тромбоцитами плазмою, а з аспіратом кісткового мозку та бичачим тромбіном для отримання активної суспензії (рис. 4). У дослідних групах зону пластики нерва вкривали клітинними суспензіями, після чого виконувалося ушивання рани.

Сідничний нерв та м'язи гомілки фіксували у 10% нейтральному формаліні. Після фіксації з нервів на кріотомі виготовляли зрізи товщиною 15–20 мкм та використовували метод імпрегнації азотнокислим сріблом. Фрагменти м'язів зневоднювали у висхідних концентраціях еталону і заливали в парафін. Парафінові зрізи забарвлювали методом гематоксилін-еозин. Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1, Німеччина) під мікроскопом Olympus BX 51 (Японія).

Для оцінки метаболічних змін у денервованих м'язах були проведені біохімічні дослідження про- та антиоксидантної системи. Для цього визначали активність ферментів антиоксидантної системи глутатіонпероксидази (GPx) (нмоль  $\cdot$  хв<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup>), глутатіонредуктази (GR) (нмоль  $\cdot$  хв<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup>), каталази (мкмоль  $\cdot$  хв<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup>) та рівень продуктів пероксидації вільних низькомолекулярних SH-груп (нмоль/мг протеїну), ТБК-реагуючих продуктів (мкмоль/г тканини), дієнових кон'югатів (нмоль/мг протеїну) і карбонільних груп (нмоль/мг протеїну).

Біохімічні показники визначали в супернатантах фрагмента нерва. Для цього фрагменти нерва гомогенізували і центрифугували при 10 тис. g протягом 20 хв та досліджували спектрофотометричним методом із використанням спектрофотометра  $\mu$ Quant, Bio-Tek (США).

Рівень загального білка визначали за методом Lowry [7]. Каталазну активність — за методом *Aebi* [1]. Концентрацію ТБК-активних продуктів визначали в гомогенатах фрагмента нерва за методом *Uchiyama* [13]. Вміст дієнових кон'югатів у фрагменті нерва вимірювали за методикою, описаною в статті В.Г. Гаврилова. Визначення рівня низькомолекулярних SH-груп здійснювали за методом *Ellman* [2]. Активність *GPx* вимірювали за зменшенням рівня NADPH у сполученій глутатіонредуктазній реакції (GR), що визначали за методом *Paglia* [10]. Ступінь окисної модифікації протеїнів колориметричним методом [14].

Активність NAD(P)H-хінон-оксидоредуктази (ДТ-діафори) визначали в реакційній суміші, що містила NADPH-генеруючу глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну систему, менадіон (2-метил-1,4-нафтохінон) та МТТ [3-(4,5-диметилтіазо-2-ил)-2,5-дифенілтетразолій бромід]. NAD(P)H-хінон-оксидоредуктаза каталізує NADPH-залежне відновлення менадіону в менадіол. Наступне утворення формагану в результаті неензимного відновлення МТТ під дією менадіолу реєстрували в діапазоні довжини хвиль 550–640 нм [6].

Порівняння отриманих результатів здійснювали за допомогою U-критерію Вілкоксона — Манна — Уїтні.

## Результати та обговорення

Дослідження травматично пошкодженого сідничного нерва тварин починали з аналізу якісних та кількісних характеристик інтактного нерва контрольної групи. Гістологія інтактного нерва подана щільно організованими нервовими волокнами (мієліновими і безмієліновими), системою кровоносних мікросудин і стромальними елементами нерва (рис. 1). Архітекtonіка останніх сформована ендо-, пери- й епіневрієм — системою колагенових волокон і фіброцитів, функціональна і просторова організація яких різко змінюється за умов травматичного ушкодження й інтоксикації. На структурному рівні нерв вкритий епіневрієм, в якому локалізовані мікросудини малого та великого діаметра. Периневрій розділяє нерв на фасцикули. Поодинокі нервові волокна та їх групи оточені ендоневрієм. В ендоневрії локалізоване мікроциркуляторне русло,

гемокапіляри орієнтовані вздовж вісі нерва. Нервові волокна сідничного нерва подані головним чином мієліновим типом, в яких перехвати Ранв'є реєструються з різним інтервалом, а муфти мієлінової оболонки мають різну товщину (рис. 1 а, б). Кількісна щільність нервових волокон в інтактному нерві становила  $9601,0 \pm 285,5$  од. мм<sup>2</sup> (табл. 1).

Гістоструктура нерва в групі 2, тобто після автопластики, мала іншу архітектоніку. Через 1 міс. після травми зона автопластики характеризувалася відновленням анатомічної будови нерва, чітко реєстрували проксимальний і дистальний шви. На гістологічному рівні фасцикули проксимального і дистального сегментів зона автопластики суттєво розрізнялася. Епіневрій нерва у 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 автопластики. Коли в терміни 1 міс. ознак регенерації нервових волокон через дистальний шов не реєстрували (рис. 1 с, d), то в терміни 3 міс. встановлено проростання осьових циліндрів у дистальний відрізок нерва в кількості  $4773,4 \pm 229,6$  нервових волокон/мм<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ), тобто 49,7 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з контрольним показником (табл. 2). 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, де використана автопластика із застосуванням суспензії ЖТ, реєстрували кращу посттравматичну регенерацію нерва. На макроскопічному рівні чітко розрізнялись окремі зони нерва (проксимальний, дистальний сегменти і зона автопластики), але ділянка нанесення жирової тканини за обсягом сполучної тканини істотно відрізнялась від ділянки після травматичної неврони дослідної групи 2. Так, відміче-

**Таблиця 1. Щільність нервових волокон у дистальному відрізку сідничного нерва через 1 та 3 місяці після початку експерименту, нервові волокна/мм<sup>2</sup> (M × m)**

Група		1 міс.	3 міс.
1-ша	Контроль	9601,0 ± 285,5	
2-га	Травма	0	4773,4 ± 229,6*
3-тя	ЖТ	0	6477,3 ± 329,5*, #
4-та	ЧКМ	851,9 ± 54,3*, #	6166,3 ± 255,9*, #
5-та	Комплекс	906,0 ± 54,4*, #, α	6680,1 ± 337,1*, #, α

**Примітки:** ЖТ — трансплантація жирової тканини; ЧКМ (аспірат червоного кісткового мозку) — трансплантація кісткового мозку; \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем, # —  $P < 0,05$  порівняно з травмою, α —  $P < 0,05$  порівняно з ЖТ.

но збільшення сполучної тканини, утворення ніжної сполучної тканини в епіневрії, проростання жирової тканини між фасцикулами нерва. Дистальний сегмент нерва характеризувався збільшенням товщини епіневрії, міграцією активованих фібробластів, стазованими мікросудинами. Основний обсяг досліджуваного сегмента представлений нейролемоцитами, проте регенерації нервових волокон через 1 міс. не встановлено (рис. 1 e, f). Через 3 міс. у дистальному відрізку нерва число регенованих нервових волокон становило  $6477,3 \pm 329,5 \text{ мм}^2$ , що на 35,6 % більше, ніж у групі 2 ( $P < 0,05$ ).

У групі 4, де застосована автопластика з ЧКМ (аспірат червоного кісткового мозку), встановлено регенерацію нервових волокон у дистальний сегмент нерва через 1 міс. на рівні  $851,9 \pm 54,3 \text{ мм}^2$  (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 нейролемоцитів, що свідчить про відновлення нейрогліальних взаємодій і зменшення рівня гліальної компенсації (рис. 1 g, h). Через 3 міс. число регенованих нервових волокон становило  $6166,3 \pm 255,9 \text{ мм}^2$ , що на 29,1 % більше, ніж у групі 2 ( $P < 0,05$ ).

У групі 5, в якій комплексно застосовувалася суспензія ЖТ і ЧКМ, також установлено проростання нервових волокон через дистальний шов. Рівень регенерації в термін 1 місяць становив  $906,0 \pm 54,4 \text{ од/мм}^2$  (9,4 % від контрольного показника,  $p < 0,05$ ), а через 3 місяці —  $6680,1 \pm 337,1 \text{ од/мм}^2$ , тобто на 39,9 % більше щодо показника в групі порівняння ( $p < 0,05$ ). Нервові волокна формували незачні кластери, між якими локалізовані елементи сполучної тканини (рис. 1 i, j), мали різний рівень мієлінізації, реєстрували поодинокі рекурентні волокна. Ці результати свідчать про те, що застосування ЖТ і ЧКМ одночасно з пластиком великих дефектів дозволяє своєчасно створити сприятливе мікросередовище для регенерації ушкодженого нерва. Для вивчення метаболічної характеристики цього мікрооточення було проведено біохімічне дослідження дистальних сегментів нерва.

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

Результати оцінки біохімічних показників сідинного нерва через 1 місяць після травми та пластики нерва в групі 2 засвідчили компенсаторну відповідь ферментативної системи антиоксидантного захисту у відповідь на утворення продуктів пероксидації. Так, через 1 місяць після пошкодження рівень ТБК-активних про-

дуктів збільшився щодо контролю в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ), дієнових кон'югатів — у 3,3 раза ( $p < 0,05$ ), карбонільних груп — у 2,7 раза ( $p < 0,05$ ). Усі зазначені сполуки утворюються в результаті дії активних форм кисню, пероксидації ліпідних та білкових молекул. Тобто після травми відбувається гіперпродукція вільних радикалів, що на клітинному рівні створюють агресивне мікрооточення в дистальному сегменті нерва. Через 3 місяці після автопластики встановлено суттєве зменшення рівня зазначених метаболітів, проте жоден показник не досягав контрольних показників.

Одночасно з цим встановлено зменшення вільних SH-вмісних сполук: у середньому в 3,7 і 2,4 раза відповідно до терміну спостереження ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Активність ферментів антиоксидантної системи змінювалась залежно від ферменту. Відмічені незначне зменшення активності GPx і GR через 1 місяць і різке збільшення через 3 місяці — майже в 3,4 і 4,8 раза ( $p < 0,05$ ). Активність каталази збільшилась у 2 рази ( $p < 0,05$ ), але в наступний термін не відрізнялась від контролю. Активність DT-діафрази різко зменшилась, хоча відмічено часткове відновлення показника (у 4,4 і 1,9 раза щодо терміну спостереження,  $p < 0,05$ ).

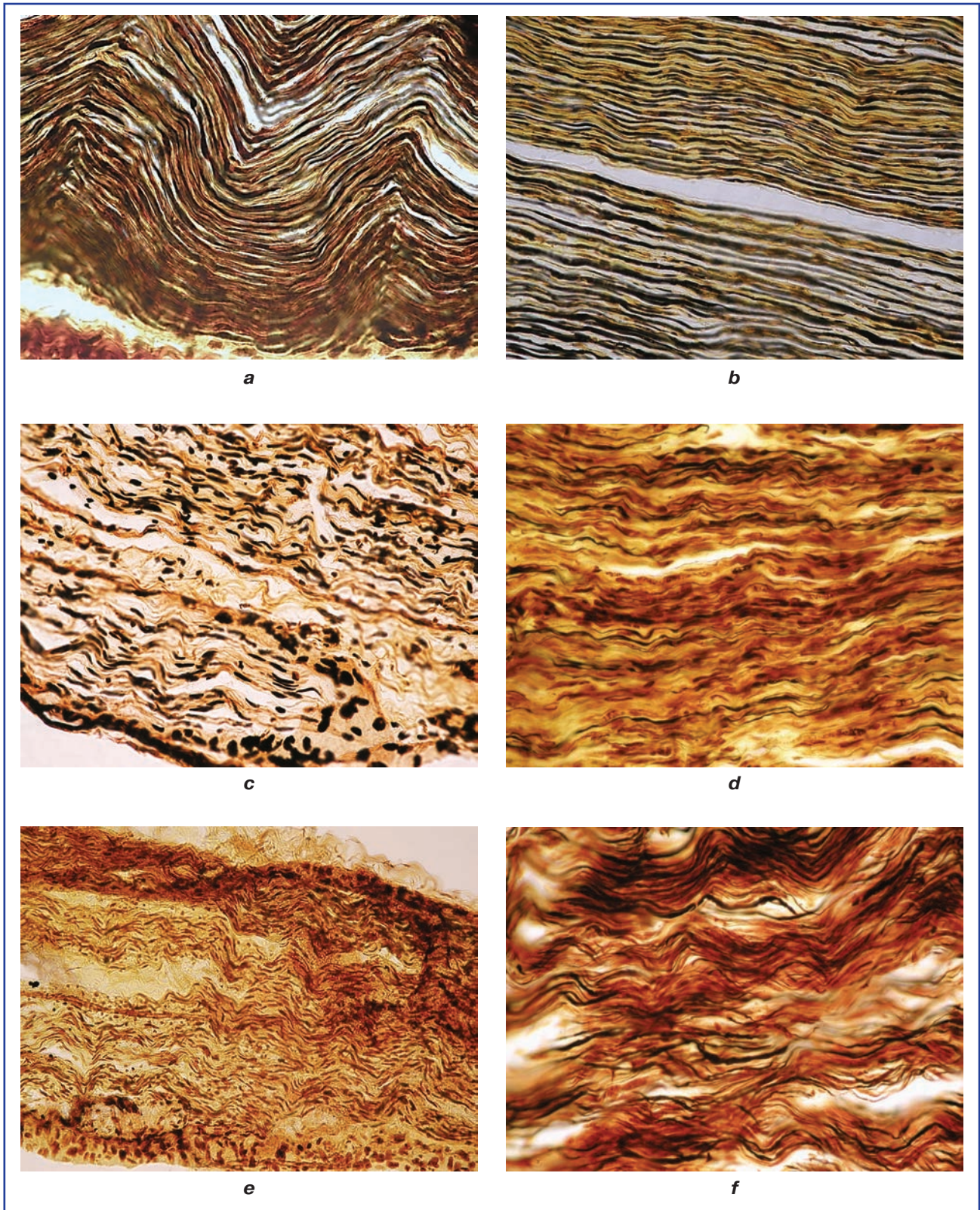
У загальній динаміці метаболічних змін можна стверджувати про компенсаторну активацію каталази в гострий період після травми і порушення в системі функціонування DT-діафрази і GR. У віддаленому періоді травми нерва встановлено компенсаторну активацію GPx і GR і часткове відновлення системи детоксикації, в якій задіяна DT-діафраза. Установлені метаболічні зміни можуть пояснити причини розвитку вторинної дегенерації в регенеруючих нервових волокнах у дистальному сегменті нерва. Аналіз змін метаболічних показників на тлі застосування суспензії мезенхімальних клітин ЖТ і ЧКМ засвідчив позитивні зміни відносно процесів пероксидації в ушкодженому нерві.

У групах тварин, яким проводили ТЖТ і ТКМ, суттєвої різниці з групою порівняння на 3-й місяць спостереження не виявлено. Різницю встановлено лише за деякими показниками.

У групі з ЖТ (група 3) зменшився рівень ТБК-реагуючих продуктів, дієнових кон'югатів і карбонільних груп у 1-й місяць ( $p < 0,05$ ). Активність каталази була меншою щодо групи 2 у всі терміни спостереження, GPx, GR — лише у віддалений період ( $p < 0,05$ ). Показник DT-діафрази не змінився.

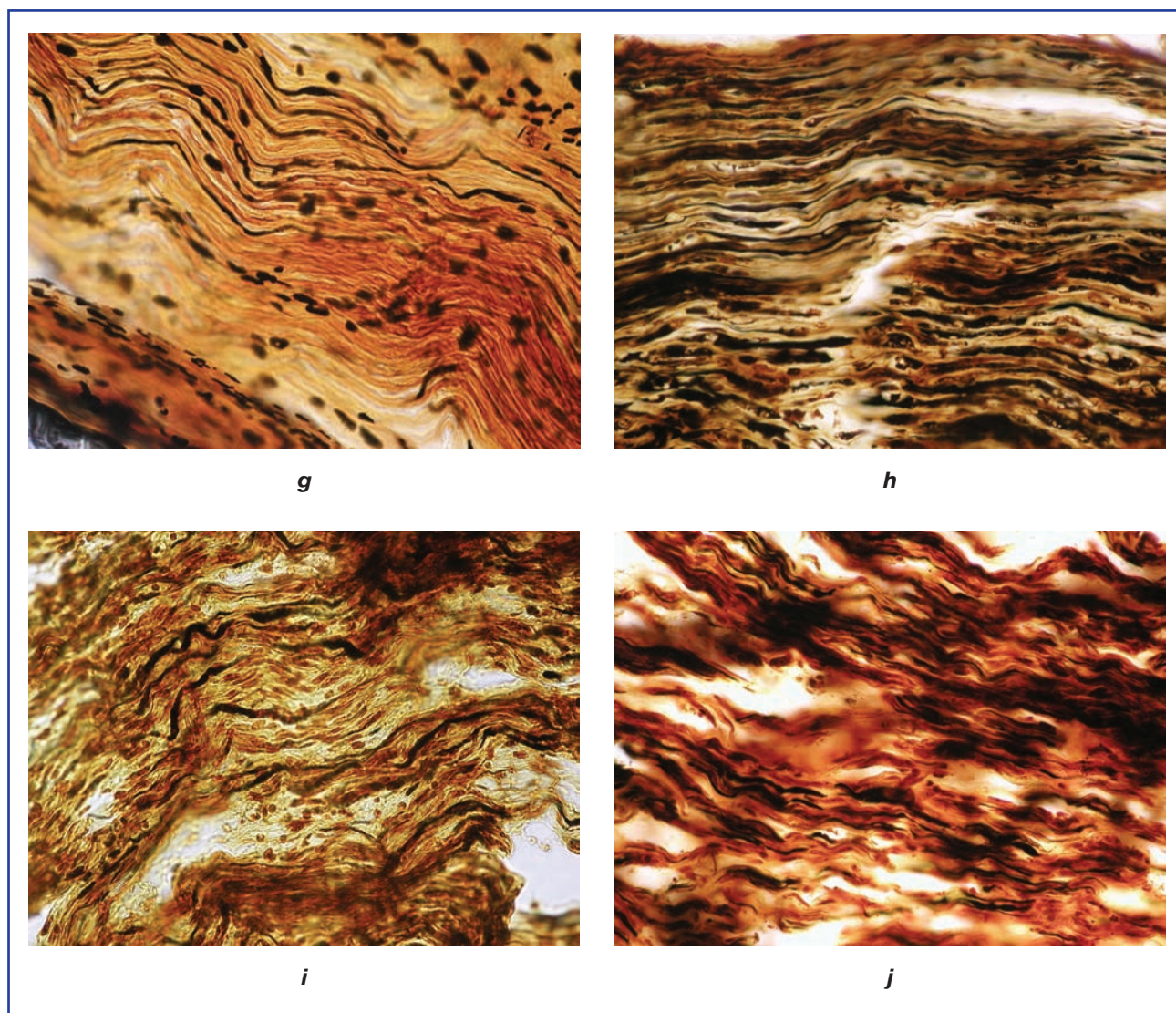
У групі з ЧКМ (група 4) рівень ТБК-реагуючих продуктів і дієнових кон'югатів зменшився в 1-й місяць ( $p < 0,05$ ), а на 3-й не відрізнявся від групи 2. Показник GR і каталази зменшився щодо групи 2 через 3 місяці після автопластики ( $p < 0,05$ ). Активність DT-діафрази суттєво збільшилась у гострому періоді травми щодо групи 2 у 3,2 раза ( $p < 0,05$ ). Незважаючи на відносну варіабельність одержаних даних, загальним висновком є те, що у віддалений період продовжується розвиток компенсаторних захисних механізмів у пошкодженому нерві, і цей рівень має тенденцію до зменшення порівняно з групою без застосування автологічних клітинних суспензій.





**Рисунок 1. Дистальний відрізок сідничного нерва через 1 і 3 міс. після пластики нерва. Одночасна регенерація та вторинна дегенерація нервових волокон у групі 3 на 3-й місяць після автопластики**  
**Примітки: a, b – контрольна група; c, d – група травми з автопластикою (1 і 3 місяці); e, f – група травми з автопластикою та ЖТ (1 і 3 місяці); g, h – група травми з автопластикою та ЧКМ (1 і 3 місяці); i, j – група травми з автопластикою, ЖТ та ЧКМ (1 і 3 місяці). Імпрегнація азотнокислим сріблом (об. 40, ок. 10).**





Закінчення рис. 1

При комбінованому застосуванні ЖТ із ЧКМ (група 5) у сідничному нерві встановлені збільшення активності GPx і GR і одночасне зниження активності каталази. При цьому продукти перекисидазії залишалися на високому рівні, і навіть їх рівень зростав за деякими показниками у віддалений період, зокрема концентрація ТБК-реагуючих продуктів була збільшеною в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). При цьому рівень SH-вмісних сполук збільшувався в 1-й місяць, але через 3 місяці не відрізнявся від групи 2.

Таким чином, дослідження метаболічних показників травматично ушкодженого нерва через 3 місяці після пластики та застосування ТЖТ і ТКМ як 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 аутологічних клітинних суспензій.

Результати експериментальних досліджень дозволили встановити особливості регенерації сідничного нерва через дефект шляхом використання методу ауто-

пластики. Установлено, що регенерація в дистальний сегмент нерва відбувається через 1 місяць після пластики, а в цей термін відмічаються гістоструктурні та метаболічні зміни. Через 3 місяці після аутопластики встановлено регенерацію лише на рівні 49,7 %.

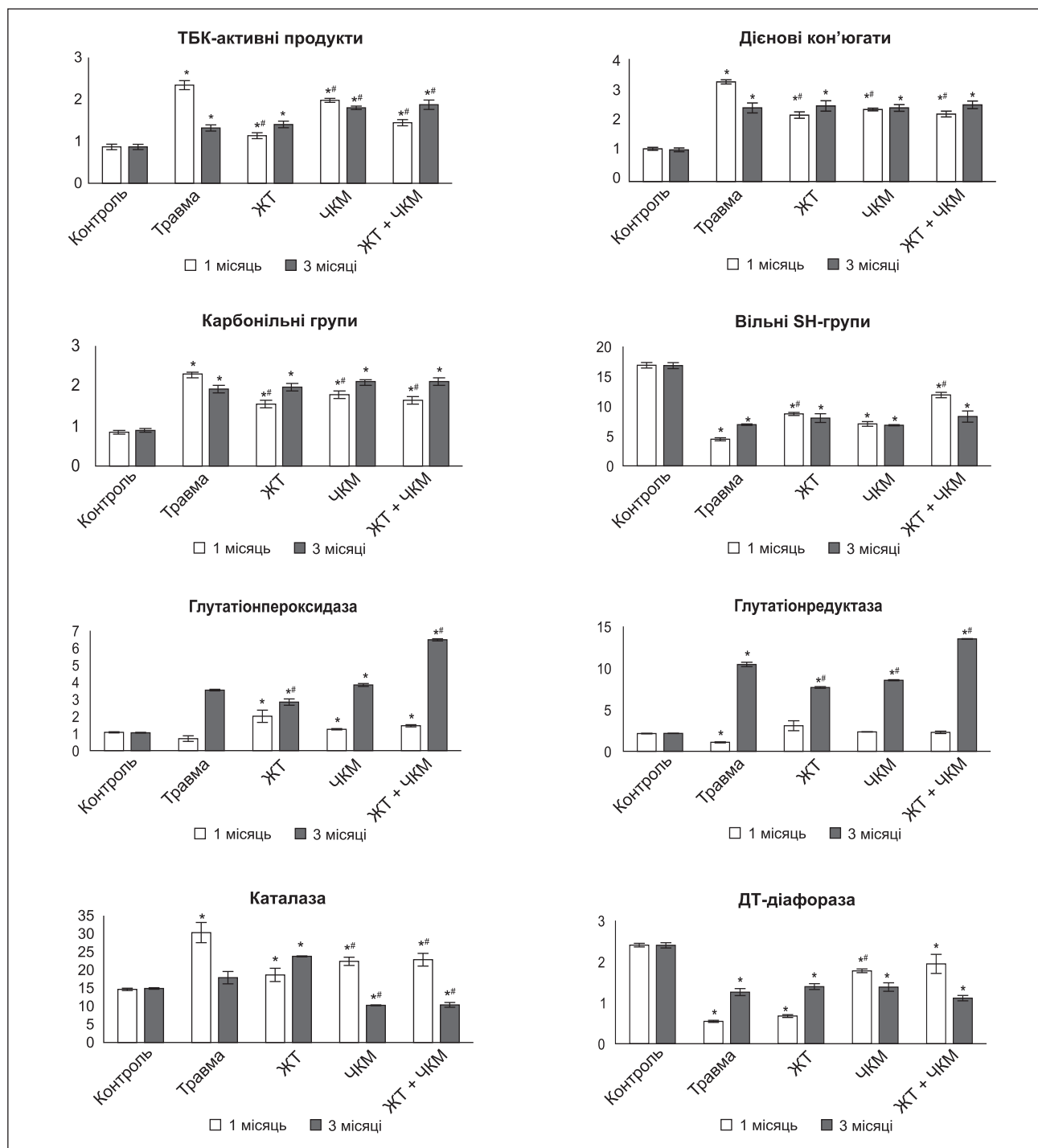
Нанесення в місці аутопластики суспензії мезенхімальних клітин ЖТ і ЧКМ, що приготовані з аутоплазмою, збагаченою тромбоцитами, позитивно вплинуло на регенерацію периферійного нерва після травми. При цьому вплив досліджуваних суспензій мав деякі відмінності.

Суспензія клітин ЖТ вплинула на активацію проростання нервових волокон крізь сегмент аутопластики травмованого нерва, при цьому відмічені ділянки з адипоцитами в епіневрії та збільшення щільності нейролемоцитів у ділянці шва. На думку авторів, жирова тканина містить велику кількість стромальних стовбурових клітин (Zuk P.A, 2001), які безпосередньо пенетрують тканину травмованого сідничного 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 в гострому періоді активувала регенерацію осьових циліндрів і нейроле-

моцитів, що підтверджується проростанням поодиноких нервових волокон через дистальний шов, проте у віддалений період регенерація характеризувалася розвитком вторинної дегенерації, хоча загальна кількість волокон також була в межах 64,2%. Активацію пришвидшення регенерації нервових волокон через ділянку автопластики можна пояснити виділенням



**Рисунок 2. Зміни біохімічних показників у дистальному сегменті сідничного нерва після травми та автопластики**

**Примітка:** ЖТ – трансплантація жирової тканини; ЧКМ – трансплантація кісткового мозку; \* – вірогідно до контролю ( $p < 0,05$ ); # – вірогідно до травми ( $p < 0,05$ ).

мезенхімальними клітинами та тромбоцитами плазми факторів росту (Mohammadi, Farouk), а причиною дегенеративних змін може бути агресивне мікрооточення в дистальному сегменті нерва, що виникає на тлі травми нерва і розвитку окислювального стресу. Для підтвердження або спростування цієї думки був проведений порівняльний аналіз про- й антиоксидантного профілю ушкодженого нерва після автопластики.

Як відомо, розвиток окислювального стресу і наступне перекисне окислення структурних компонентів клітин (ліпідів плазматичних мембран, білків та нуклеопротеїдів) є одним із основних патогенетичних шляхів пошкодження тканин і органів при травматичному й ішемічному ураженні. Підвищення інтенсивності процесів перекисного окислення 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 окислювального стресу та параметром оцінки рівня патобіохімічних змін є накопичення первинних і вторинних продуктів вільнорадикального окислення. Найбільш інформативними показниками рівня окислювального стресу є утворення дієнових кон'югатів із окислених ліпідів, а також малонового діальдегіду. Малоновий діальдегід виникає в тканинах при деградації поліненасичених жирів на тлі ушкодження активними формами кисню, служить маркером ПОЛ й окислювального стресу та визначається не лише в тканинах, а й 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, а й до білків позаклітинного матриксу, факторів росту, білків мікросудин. Особливо легко окислюються білки, що містять у своєму поліпептидному ланцюзі 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 окислювального 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, зі свого боку, можуть взаємодіяти з аміногрупами, що в результаті призводять до утворення поперечних зшивок між білковими молекулами і порушення їх активності.

У проведених експериментальних дослідженнях було встановлено, що через 1 місяць після ушкодження сідничного нерва та його автопластики відбуваються розвиток ПОЛ та деградація білків у дистальному сегменті нерва, що є результатом травматичного, ішемічного та метаболічного ушкодження. Основни-

ми показниками цих розладів є: 1) утворення ТБК-активних продуктів (продукти ПОЛ, що взаємодіють із тіобарбітуровою кислотою), основним компонентом яких є малоновий діальдегід; 2) утворення дієнових кон'югатів; 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 (активні форми кисню). Зниження рівня глутатіону викликає зростання рівня активних форм кисню, піддає клітку ризику окисного пошкодження. Разом із тим надлишкова продукція глутатіону є індикатором розвитку окислювального стресу, що згодом призводить до клітинної загибелі.

Синтез глутатіону *de novo* та його відновлення реалізуються АТФ-залежним шляхом, тобто порушення мітохондріальної функції корелює із зниженням відновленого глутатіону. З урахуванням цього важливим було оцінити рівень метаболічних розладів мітохондрій. Одним із таких показників є активність DT-діафори (NAD(P)H-хіноноксидоредуктази; КФ 1.6.99.2) — ферменту, синтез якого активується при окислятивному стресі та який бере участь принаймні в трьох системах біохімічних реакцій: 1) відновленні хінонів, 2) підтриманні ендогенних антиоксидантів у відновленій активній формі, 3) регуляції стабільності пухлинного супресора — протеїну p53. Крім того, DT-діафора координовано стимулюється з іншими ензимами детоксикації, такими як глутатіон-S-трансфераза [9].

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

Рівень продуктів пероксидації також зменшувався в гострому періоді і надалі зростає. Таку динаміку встановлено щодо карбонільних груп і дієнових кон'югатів при застосуванні суспензії клітин як ЖТ, так і ЧКМ, а рівень ТБК-активних продуктів у групах 4 і 5 навіть зростає. 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, насамперед слід відзначити його участь у захисті клітин від продуктів окислювального стресу. Так, глутатіонпероксидаза (GPx; номенклатура ферментів: EC 1.11.1.9) за участю глутатіону відновлює перекис водню до води, відновлює органічні продукти гідропероксидації до відповідних спиртів.

Активізація глутатіонзалежної антиоксидантної ферментної системи нейтралізує реакції ПОЛ і підтримує у відновленому стані SH-групи протеїнів, забезпечуючи цим їх функціональну активність. GPx — один з основ-



них ферментів цієї системи, що каталізує відновлення пероксиду водню й інших органічних гідропероксидів до води і спиртів з одночасним окисленням відновленого глутатіону.

Різне збільшення активності цих ферментів у віддаленому періоді після автопластики в групах 2–5 можна пояснити компенсаторними реакціями, що спрямовані на відновлення антиоксидантної системи. При цьому найбільше підвищення 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 в групах 4 і 5 навіть була меншою за контрольні значення. На противагу цьому активність ДТ-діафорида спершу зростала, але в наступний період не відрізнялась від групи 2.

## Висновки

На відновні процеси в травмованому нерві впливає не лише техніка пластики нерва, але й периневральне мікрооточення, що формується на тлі травми. Значну роль у системі антиоксидантного захисту відіграють механізми синтезу та відновлення глутатіону, оскільки вони безпосередньо утилізують АФК та продукти пероксидації, а також опосередковано сприяють клітинній репарації. Характерним для виникнення агресивного мікрооточення в нерві є зниження рівня ферментативних та неферментативних систем детоксикації, при цьому застосування аутологічної суспензії клітин ЖТ забезпечує нейтралізацію реакцій ПОЛ, пригнічує утворення продуктів пероксидації, позитивно впливає на рівень антиоксидантної системи та сприяє регенерації нерва. На противагу цьому застосування суспензії клітин ЧКМ забезпечило відносно короткотривалу дію, оскільки в подальшому регенерація характеризувалась одночасною дегенерацією нервових волокон. У результаті досліджень встановлено вірогідний позитивний вплив застосування клітинних технологій на регенерацію нерва, як на морфологічну структуру, так і на біохімічні процеси. Таким чином, отримані експериментальні дані можуть бути підґрунтям для використання аутологічних мезенхімальних клітин жирової тканини для стимулювання відновних процесів у травматично пошкодженому периферійному нерві.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

## Список літератури

1. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // *Meth. Enzymol.* — 1984. — Vol. 105. — P. 121-126.
2. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1959. — Vol. 82, № 1. — P. 70-77.
3. Farouk A. Angiogenesis induced by autologous whole bone marrow stem cells seeded on collagen scaffolds in silicone nerve tubes. An experimental study / A. Farouk Abd El Azeem, Hatem Mostafa Hussin Al-Ahmady, Mustafa Ahmad Abdul Rahman [et al.] // *Tanta Dental. Journal.* — 2014. — Vol. 11, Is. 3. — P. 227-234.
4. Gavrilo V.B. Izmerenie dienovyih kon'yugatov v plazme krovi po UF-pogloscheniyu geptanovyih i izopropanolnyih ekstraktov / V.B. Gavrilo, A.R. Gavrilo, N.F. Hmara // *Labor. delo.* — 1988. — № 2. — P. 60-63.
5. Gordon T. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair / T. Gordon, N. Tyreman, M.A. Raji // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* — 2011. — Vol. 31. — P. 5325-5334.
6. Lind C., Cadenas E., Hochstein P., Ernster L. DT-diaphorase: purification, properties, and function // *Methods in Enzymology.* — 1990. — № 186. — P. 287-301.
7. Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.I. Randal // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265-275.
8. Mohammadi R. The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats / R. Mohammadi, S. Azizi, N. Delirez [et al.] // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* — 2012. — Vol. 41(5). — P. 650-656.
9. Nioi P. Contribution of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors / P. Nioi, J.D. Hayes // *Mutat. Res.* — 2004. — Vol. 555(1-2). — P. 149-171.
10. Paglia D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D.E. Paglia, W.N. Valentine // *J. Clin. Med.* — 1967. — Vol. 70. — P. 158-169.
11. Pompilio G. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection / G. Pompilio, A. Cannata, F. Peccatori [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* — 2004. — Vol. 78(5). — P. 1808-1812.
12. Ratajczak M.Z. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance / M.Z. Ratajczak, E.K. Zuba-Surma, M. Wysoczynski [et al.] // *Exp. Hematol.* — 2008. — Vol. 36(6). — P. 742-751.
13. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 86(1). — P. 271-278.
14. Zaytseva O.V. Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups / O.V. Zaytseva, S.G. Shandrenko // *Ukr. Biokhim. Zhurn.* — 2012. — Vol. 84(5). — P. 112-116.
15. Zuk P.A. Multiline age cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno [et al.] // *Tissue Engineering.* — 2001. — Vol. 7(2). — P. 211-228.
16. GUIDE LABORATORY ANIMALS FOR THE CARE AND USE OF Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. — The National academies press, NW Washington, DC, 2011.

Отримано 12.02.2018 ■

Гайович І.В.<sup>1</sup>, Савосько С.І.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Інститут травматології і ортопедії НАМН України», г. Київ, Україна

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Київ, Україна

### Отдаленные результаты влияния клеточных технологий на регенерацию седалищного нерва при пластике большого дефекта (экспериментальное исследование)

**Резюме. Актуальность.** Аутопластика при повреждении нерва не всегда приводит к удовлетворительным результатам. Особенно это важно учитывать при больших повреждениях нервов (более 10 см), когда за время прорастания аксонов к месту дистального шва происходит фиброз зоны дистального шва, что делает невозможным дальнейшую регенерацию нерва и приводит к неудовлетворительным функциональным результатам. **Целью** исследования было изучить влияние аспирата костного мозга и суспензии жировой ткани на регенерацию нервов при пластике больших дефектов. **Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 25 половозрелых кроликах. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп: 2 контрольные (в 1-й нерв оставался невредимым, во 2-й выполнялась только аутопластика дефекта), в 3-й группе применялись аутопластика нерва и трансплантация жировой ткани, в 4-й — пластика нерва с использованием суспензии костного мозга, в 5-й — пластика нерва с комбинированным применением клеточных суспензий. **Результаты.** Через 1 и 3 месяца животных выводили из эксперимента и

образцы исследовались гистологически и морфометрически. Морфометрический анализ через 1 месяц показал, что прорастание аксонов через дистальный шов наблюдалось только в группах, в которых применялся аспират костного мозга, через 3 месяца в контрольной группе доля проросших аксонов составляла 49,7 %, в группах исследования она была значительно выше — до 64 % в группе, где применялась комбинация жировой ткани и аспирата костного мозга. Биохимические показатели, такие как ДТ-диафороза, уровень диеновых конъюгатов, ТБА-активных продуктов, через 3 месяца были ближе к норме в группах использования клеточной технологии. **Выводы.** В результате исследований установлено вероятное положительное влияние применения клеточных технологий на регенерацию нерва, как на морфологическую структуру, так и на биохимические процессы. Наилучшие результаты получены в группе применения комбинации аспирата костного мозга и жировой ткани.

**Ключевые слова:** регенерация; повреждение нерва; аспират костного мозга; жировая ткань

I.V. Gayovich<sup>1</sup>, S.I. Savosko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Institution "Institute of Traumatology and Orthopaedics of the NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

### Long-term effects of cell technologies on sciatic nerve regeneration in plasty of large defect (experimental study)

**Abstract. Background.** Autoplasty after nerve injury does not always lead to satisfactory results. This is especially important for large damage to the nerves (more than 10 cm) when during time of regeneration to the site of the distal suture, there is a fibrosis of the distal area which makes impossible further nerve regeneration and as a result leads to poor functional outcome. The purpose of the study was to investigate the effect of bone marrow aspirate and fatty tissue suspension on regeneration of nerves subjected to the plasty of large defects. **Materials and methods.** Experiments were conducted on 25 sexually mature rabbits. There were 5 experimental groups (2 controls: in the first one, nerve remained intact, in the second one, only autoplasty of the defect was carried out). In the third group, autoplasty of the nerve and transplantation of adipose tissue were performed; in group 4 — nerve plasty with application of bone marrow suspension; in group 5 — nerve plasty with combined application of cell suspensions. **Results.** After 1 and 3 months, the animals were sacrificed, and the specimens

were examined histologically and morphometrically. Morphometric analysis 1 month after showed that axon sprouting through a distal suture was observed only in groups in which bone marrow aspirate was used. After 3 months in the control group, the number of sprouted axons was 49.7 %, and in the experimental groups it was significantly higher — up to 64 % in the group which used a combination of adipose tissue and bone marrow aspirate. Biochemical indices such as DT-diaphorase, level of diene conjugates, TBA-reactive substances in 3 months were closer to the norm in groups where cellular technologies were used. **Conclusions.** As a result of the research, a significant positive effect of cell technologies on nerve regeneration was established, both on the morphological structure and biochemical processes. The best results were obtained in the group where the combination of bone marrow and adipose tissue was used.

**Keywords:** regeneration; nerve damage; bone marrow aspirate; fatty tissue