

І. В. Гайович, С. С. Страфун, І. Ф. Лабунець*, Н. О. Утко*, С. І. Савосько**

Державна установа “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”, 01601 Київ

**Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, 04114 Київ*

***Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, 01601 Київ*

СТРУКТУРНІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ОСНОВИ РЕГЕНЕРАЦІЇ СІДНИЧОГО НЕРВА ПРИ ПЛАСТИЦІ ВЕЛИКОГО ДЕФЕКТУ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Аутопластика при ушкодженні нерву не завжди призводить до задовільних результатів. Особливо важливо це за великих ушкоджень нервів (більше 10 см), коли за час проростання аксонів до місця дистального шва відбувається фіброз зони дистального шва, що унеможлиблює 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. 5 експериментальних груп (2 контрольні в першій нерв залишався неушкодженим, в другій проводилася лише аутопластика дефекту). В третій групі застосовувалася аутопластика нерва і трансплантація жирової тканини; 4 — пластика нерва з застосуванням суспензії кісткового мозку; 5 — пластика нерва з комбінованим застосуванням клітинних суспензій. Через 1 та 3 міс тварини виводилися з експерименту та зразки досліджувалися гістологічно та морфометрично. В результаті досліджень встановлено достовірний позитивний вплив застосування клітинних технологій на регенерацію нерва, як на морфологічну структуру так і на біохімічні процеси. Найкращі результати отримані в групі де застосовувалася комбінація аспірату кісткового мозку та жирової тканини.

Ключові слова: Регенерація, ушкодження нерва, аспірат кісткового мозку, жирова тканина.

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

ним, а стимулюючий вплив щодо регенерації тканин доведеним [5, 12]. Проте технологічне отримання факторів росту людини (human growth factor) та фармакоекономічні труднощі є перешкодою для їх широкого використання. Тому одним з 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

Інститут травматології та ортопедії НАМН України

С. С. Страфун — заст. директора з наукової роботи, чл.-кор. НАМН України, д.м.н., професор

І. В. Гайович — аспірант клініки мікрохірургії та реконструктивної хірургії верхньої кінцівки (gajigor@gmail.com)

Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України

*І. Ф. Лабунець — зав.лабораторії експериментального моделювання, д.м.н., с.н.с.

*Н. О. Утко — лабораторія експериментального моделювання відділу клітинних та тканинних технологій, к.б.н.

**С. І. Савосько — асистент кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця

© І. В. Гайович, С. С. Страфун, І. Ф. Лабунець, Н. О. Утко, С. І. Савосько, 2017.

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 робіт.

На сьогодні в якості такого аутологічного продукту відносно широкого застосування стала 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- 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 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 з тим, є дані про низькі показники виживання і онкогенність імплантованих мезенхімальних 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 метаболічної підтримки денервованих м'язів гомілки.

Матеріал та методи. Експерименти проведені на 25 статевозрілих кролях, вагою 3,2-3,5 кг. Тварини були розподілені на 5 груп: 1) контрольна група (без ушкодження сідничого нерва); 2) дослідна група (пластика сідничого нерва); 3) аутопластика нерва і трансплантація жирової тканини (ЖТ); 4) пластика нерва з застосуванням суспензії червоного кісткового мозку (ЧКМ); 5) пластика нерва з комбінованим застосуванням клітинних суспензій.

Премедикацію та знеболення дослідних тварин здійснювали введенням тіопенталу натрію (внутрішньоочеревинно, 60 мг/кг маси тіла). 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" [14]. Тваринам висікали фрагмент сідничого нерва довжиною 1 см, та здійснювали пластику виділеним сегментом нерва. В третій групі забір 1 мл. жирової клітковини здійснювали з ділянки великого сальника через 1 см доступ до черевної порожнини. Після чого забрану жирову тканину подрібнювали та гомогенізували 10-кратним пропусканням через 1 мл канюлю. До жирової тканини додавали 1 мл аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми, яку отриману з 5 мл венозної крові шляхом центрифугування мозку з цитратом декстрази (1:8) 16 хв при 740g- та здійснювали забір 1мл шару плазми багатой тромбоцитами над еритроцитарною масою, після чого додавали 0,1 мл бичачого тромбіну для утворення суспензії жирової тканини та збагаченої тромбоцитами плазми.

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

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

Сідничий 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 у парафін. Парафінові зрізи забарвлювали методом гематоксилін-еозином. 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 прота антиоксидантної системи. Для цього визначали активність ферментів антиоксидантної системи глу-

татіонпероксидази (*GPx*) — нмоль/(хв·мг білка), глутатіонредуктази (*GR*) — нмоль/(хв·мг білка), каталази — мкмоль/(хв·мг білка) та рівень продуктів пероксидації вільних низькомолекулярних SH-груп (нмоль/мг білка), ТБК-реагуючих продуктів (мкмоль/г тканини), дієнових кон'югатів (нмоль/мг білка) і карбонільних груп (нмоль/мг білка).

Біохімічні показники визначали у супернатантах фрагмента нерва. Для цього фрагменти нерва гомогенізували і центрифугували при 10 тис. g протягом 20 хв та досліджували спектрофотометричним методом на спектрофотометрі *μQuant*, *Bio-Tek* (США).

Рівень загального білка визначали за методом *Lowry* [7]. Каталазну активність визначали 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 у статті В. Г. Гаврилова [Гаврилов]. Визначення рівня низькомолекулярних SH-груп здійснювали за методом *Ellman* [2]. Активність *GPx* вимірювали за зменшенням рівня *NADPH* в сполученій глутатіонредуктазної (*GR*) визначали за методом *Paglia* [10]. Ступінь окисної модифікації протеїнів (ОМП) оцінювали за вмістом карбонільних похідних протеїнів колориметричним методом [16].

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 у менадіол. Наступне утворення формазану в результаті неензимного відновлення МТТ під дією менадіолу реєстрували в діапазоні довжин хвиль 550-640 нм [6].

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

Результати та їх обговорення. Дослідження травматично пошкодженого сідничого нерва тварин починали з аналізу якісних та кількісних характеристик інтактного нерва контрольної групи. Гістологія інтактного нерва представлена щільно організованими нервовими волокнами (мієліновими і безмієліновими), системою кровоносних мікросудин і стромальними елементами нерва (рис. 1). Архітектоніка останніх сформовані ендоневральною і епіневральною — системою колагенових волокон і фіброцитів, функціональна і просторова організація яких різко змінюється за умов травматичного ушкодження та інтоксикації. На структур-

ному 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. Кількісна щільність нервових волокон в інтактному нерві становила $9601,0 \pm 285,5$ од. мм^2 (табл. 1).

Таблиця 1

Щільність нервових волокон у дистальному відрізку сідничого нерва через 1 та 3 міс після початку експерименту, *нервові волокна/мм²* ($M \pm m$)

Група		1 міс	3 міс
1	Контроль	$9601,0 \pm 285,5$	
2	Травма	0	$4773,4 \pm 229,6^*$
3	Травма + ЖТ	0	$6477,3 \pm 329,5^{**}$
4	Травма + ЧКМ	$851,9 \pm 54,3^{\#}$	$6166,3 \pm 255,9^{**}$
5	Травма + ЖТ + ЧКМ	$906,0 \pm 54,4^{\#\alpha}$	$6680,1 \pm 337,1^{**}$

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.

Гістоструктура нерва у групі 2, тобто після аутопластики мала іншу архітектоніку. 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 істотно розрізнялися. Епіневрій нерва у тварин дослідної групи представлений товстою смугою щільної сполучної тканини, особливо в ділянці епіневрального шва.

Ділянка дистального шва характеризувалася посттравматичною активацією нейроремодулюючих клітин, 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 терміні 1 міс ознак регенерації нервових волокон через дистальний шов не реєстрували (рис. 1, травма з аутопластикою), то у термін 3 міс встановлено проростання осьових циліндрів у дистальний відрізок нерва у кількості $4773,4 \pm 229,6$ нервових волокон/ мм^2 ($P < 0,05$), тобто 49,7 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольним показником. При цьому відзначено 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 аутопластики з застосуванням суспензії ЖТ, реєстрували більш виражену посттравматичну регенерацію нерва. На макроскопічному рівні чітко розрізнялися окремі зони нерва (проксимальний, дистальний сегменти і зона аутопластики), але ділянка нанесення жирової тканини за об'ємом сполучної тканини істотно відрізнялася від ділянки після травматичної неврони дослідної групи 2. Так, відзначено збільшення сполучної тканини, утворення "ніжної" 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 нейролемоцитами, проте регенерації нервових волокон через 1 міс не встановлено (рис. 1, травма з аутопластикою та ЖТ). Через 3 міс у дистальному відрізку нерва число регенованих нервових волокон становило $6477,3 \pm 329,5$ од./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 міс на рівні ($851,9 \pm 54,3$) од./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 нейролемоцитів, що свідчить про відновлення нейро-гліальних взаємодій і зменшення рівня гліальною компенсації (рис. 2, травма з аутопластикою та ЧКМ). Через 3 міс число регенованих нервових волокон становило ($6166,3 \pm 255,9$) од./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 міс становив ($906,0 \pm 54,4$) од./мм² (9,4 % від контрольного показника, $P < 0,05$), а через 3 міс — ($6680,1 \pm 337,1$) од./мм², тобто на 39,9 % більше щодо показника у групі порівняння ($P < 0,05$). Нервові волокна формували незначні кластери, між якими локалізовані елементи сполучної тканини (див. рис. 1, Травма з аутопластикою, ЖТ або ЧКМ), 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.

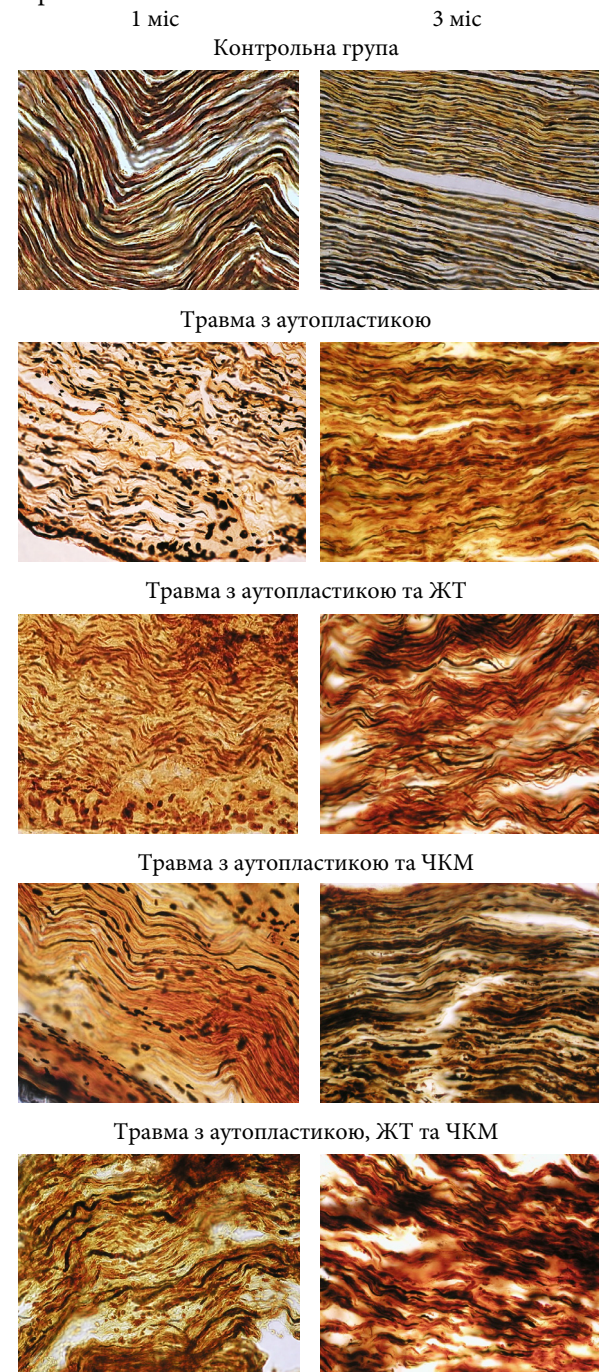


Рис. 1. Дистальний відрізок сідничого нерва через 1 і 3 міс після пластики нерва. Одночасна регенерація та вторинна дегенерація нервових волокон у групі 3 на 3 міс після аутопластики. Імпрегнація азотно-кислим сріблом (об. 40, ок. 10).

Таким чином, встановлено достовірну різницю в щільності проростання нервових волокон через

шов у всіх групах де застосовувалися клітинні технології порівняно з контролем ($P < 0,05$). Достовірної різниці за щільністю волокон між групами де застосовувалися різні суспензії не виявлено, проте в групі де застосовувалася суміш жирової тканини та аспірату кісткового мозку вона була найвищою, а морфологічно структура параневрального оточення найбільше відповідала здорової тканині з відтворенням тканини ковзання.

Результати оцінки біохімічних показників сідничого нерва через 1 міс після травми та пластики нерва у групі 2 засвідчили компенсаторну реакцію ферментативної системи антиоксидантного захисту у відповідь на утворення продуктів пероксидації. Так, через 1 міс після пошкодження рівень ТБК-активних продуктів збільшився щодо контролю у 2,7 рази ($P < 0,05$), дієнових кон'югатів — у 3,3 рази ($P < 0,05$), карбонільних груп — у 2,7 рази ($P < 0,05$). Усі зазначені сполуки утворюються в результаті дії активних форм кисню, пероксидації ліпідних та білкових молекул. Тобто після травми відбувається гіперпродукція вільних радикалів, які на клітинному рівні створюють агресивне мікрооточення у дистальному сегменті нерва. Через 3 міс після аутопластики встановлено істотне зменшення рівня зазначених метаболітів, проте жоден з них не досягав значень контрольних показників.

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

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

У групах тварин, яким проводили ЖТ і ЧКМ істотної різниці з групою порівняння на 3-й міс спостереження не виявлено. Різницю встановлено лише за деякими показниками.

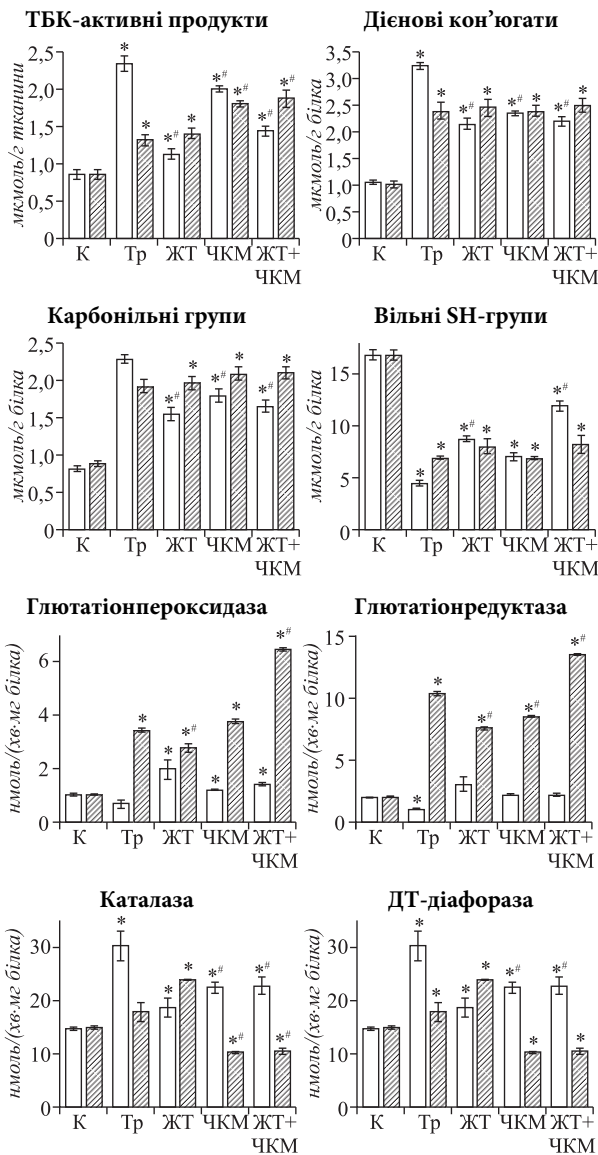


Рис. 2. Зміни біохімічних показників у дистальному сегменті сідничого нерва після травми та аутопластики. К — контроль, ТР — травма, ЖТ — трансплантація жирової тканини, ЧКМ — трансплантація кісткового мозку; * — $P < 0,05$ порівняно з контролем, # — $P < 0,05$ порівняно з травмою.

У групі з ЖТ (група 3) зменшився рівень ТБК-реагуючих продуктів, дієнових кон'югатів і карбонільних груп у термін 1-го міс ($P < 0,05$). Активність каталази була меншою щодо групи 2 в усі терміни спостереження. У групі з ЧКМ (група 4) рівень ТБК-реагуючих продуктів і дієнових кон'ю-

гатів зменшилися у термін 1-го міс ($P < 0,05$), а на 3-й міс не відрізнялися від групи 2. Показники GR і каталази зменшилися щодо групи 2 через 3 міс після аутопластики ($P < 0,05$). Активність DT-діафрази істотно збільшилася у гострому періоді травми щодо групи 2 у 3,2 рази ($P < 0,05$). Незважаючи на відносну варіабельність одержаних даних загальним висновком є те, що у віддалений період продовжується розвиток компенсаторних захисних механізмів у пошкодженому нерві, який має тенденцію до зменшення порівняно із групою без застосування аутологічних клітинних суспензій.

При комбінованому застосуванні ЖТ з ЧКМ (група 5) у сідничому нерві встановлено збільшення активності GPx і GR і одночасне зниження активності каталази. При цьому рівень продуктів пероксидації залишався високим і навіть зростав за деякими показниками у віддалений період, зокрема концентрація ТБК-реагуючих продуктів була збільшеною у 1,4 рази ($P < 0,05$). При цьому рівень SH-вмісних сполук збільшувався у терміні 1-го міс, але у термін 3-х міс не відрізнявся від групи 2.

Отже, дослідження метаболічних показників травматично ушкодженого нерва через 3 міс 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 аутологічних клітинних суспензій.

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

Нанесення у 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 відзначено ділянки з адипоцитами у епіневрії та збільшення щільності нейролемоцитів у ділянці шва. На думку авторів, жирова тканина містить велику кількість стромальних стовбурових клітин [15], які безпосередньо пенетрують тканину травмованого сідничого нерва, активують ангиогенез, метабо-

лічний потенціал ендотелію мікросудин, нейролемоцитів, що впливає на регенерацію нервових волокон. Цим можна пояснити підвищення рівня регенерації нервових волокон до 67,4 %. Клітини ЖТ сприяли регенерації нерва та запобігали розвитку вторинної дегенерації у віддалений період.

Суспензія клітин ЧКМ у гострому періоді істотно активувала регенерацію осьових циліндрів і нейролемоцитів, що підтверджується проростанням поодиноких нервових волокон через дистальний шов, 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 [8], а причиною дегенеративних змін може бути "агресивне" мікрооточення у дистальному сегменті нерва, що виникає на фоні травми нерва і розвитку оксидативного стресу. Для підтвердження або спростування цієї думки було проведено порівняльний аналіз про- та антиоксидантного профілю ушкодженого нерва після аутопластики.

Як відомо, при окиснювальному стресі наступне перекисне окиснення структурних компонентів клітин (ліпідів плазматичних мембран, білків та нуклеопротейдів), що є одним з основних патогенетичних шляхів пошкодження тканин і органів при травматичному і 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 багатоконпонентної 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 ліпідів, а також маломовного діальдегіду (МДА). МДА 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.

Одночасно з цим відбувається окислювальна модифікація білків (ОМБ). Вільні радикали пошкоджують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи їх первинну, вторинну і третинну структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули, тобто втрати її функціонального призначення. Це має відно-

шення не лише до структурних білків мембран та цитоплазми, але і 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 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 дослідження було встановлено, що через 1 міс після пошкодження сідничого нерва та його аутопластики відбуваються 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 у пошкоджених протеїнах; 4) пошкодження 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 (АФК). Зниження рівня глутатіону викликає зростання рівня АФК, піддає клітину ризику окисного пошкодження. Разом з тим надлишкова продукція глутатіону є індикатором розвитку окисного стресу, що згодом призводить до клітинної загибелі.

Синтез глутатіону *de novo* та його відновлення реалізуються за АТФ-залежним шляхом, тобто порушення мітохондріальної функції корелює зі зниженням відновленого глутатіону. Враховуючи це, було важливим оцінити рівень метаболічних розладів мітохондрій. Одним із таких показників є активність ДТ-діафрази (NAD(P)H-хінооксидоредуктази; КФ 1.6.99.2) — ферменту, синтез якого активується при оксидативному стресі і який бере участь, принаймні, у 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, ДТ-діафраза координовано стимулюється з ін-

шими ензимами детоксикації, такими як глутатіон-S-трансфераза [9].

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

Рівень продуктів пероксидації також зменшувався у гострому періоді і надалі зростає. 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 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, у першу чергу слід відзначити його участь у захисті клітин від продуктів окисного стресу. Так, глутатіонпероксидаза (GPx; КФ 1.11.1.9) за участі глутатіону відновлює перекис водню до води, а органічні продукти гідропероксидації до відповідних спиртів.

Активація глутатіонзалежної антиоксидантної ферментної системи нейтралізує реакції ПОЛ і підтримує у відновленому стані SH-групи білків, 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 окисленням відновленого глутатіону.

Різка збільшення активності цих ферментів у віддаленому періоді після аутопластики у групах 2-5 можна пояснити компенсаторними реакціями, 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 міс після травми залишалась підвищеною, але через 3 міс зменшувалася, а у групах 4 і 5 навіть була нижче контрольних значень. На противагу цьому активність ДТ-діафрази спершу зростала, але у наступний період не відрізнялася від групи 2.

Висновки

На відновні процеси у травмованому нерві впливає не лише техніка пластики нерва але і периневральне мікрооточення, що формується на фоні 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 у 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 протидію цьому застосування суспензії клітин ЧКМ забезпечило відносно короткотривалу дію, оскільки у подаль-

шому регенерація характеризувалася одночасною дегенерацією нервових волокон. У результаті досліджень встановлено достовірний 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.

Список використаної літератури

1. *Aebi H.* Catalase *in vitro* // *Meth. Enzymol.* — 1984. — **105**. — P. 121-126
2. *Ellman G.* Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1959. — **82**, № 1. — P. 70-77.
3. *Farouk A., Al-Ahmady H., Rahman M.* et al. Angiogenesis induced by autologous whole bone marrow stem cells seeded on collagen scaffolds in silicone nerve tubes. An experimental study // *Tanta Dental Journal.* — 2014. — **11**, Iss. 3. — P. 227-234.
4. *Gavrilov V. B., Gavrilova A. R., Hmara N. F.* Izmerenie dienovyih kon'yugatov v plazme krovi po UF-pogloscheniyu heptanovyih i izopropanolnyih ekstraktov // *Labor. delo.* — 1988. — № 2. — S. 60-63.
5. *Gordon T., Tyreman N., Raji M. A.* The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* — 2011. — **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., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. I.* Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — **193**, № 1. — P. 265-275.
8. *Mohammadi R., Azizi S., Delirez N.* et al. The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* — 2012. — **41**, № 5. — P. 650-656.
9. *Nioi P., Hayes J. D.* 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 // *Mutat. Res.* — 2004. — **555**, № 1-2. — P. 149-171.
10. *Paglia D. E., Valentine W. N.* Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // *J. Clin. Med.* — 1967. — **70**. — P. 158-169.
11. *Pompilio G., Cannata A., Peccatori F.* et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection // *Ann. Thorac. Surg.* — 2004. — **78**, № 5. — P. 1808-1812.
12. *Ratajczak M. Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M.* et al. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance // *Exp. Hematol.* — 2008. — **36**, № 6. — P. 742-751.
13. *Uchiyama M., Mihara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* — 1978. — **86**, № 1. — P. 271-278.
14. *Vaughn S. E.* Review of the third edition of the Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. sci.* — 2012. — **51**, № 3. — P. 298-300.
15. *Zaytseva O.V., Shandrenko S. G.* Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups // *Ukr. Biokhim. Zhurn.* — 2012. — **84**, № 5. — P. 112-116.
16. *Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H.* et al. Multiline age cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies // *Tissue Engineering.* — 2001. — **7**, № 2. — P. 211-228.

Одержано _____

**СТРУКТУРНЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕДАЛИЩНОГО
НЕРВА ПРИ ПЛАСТИКЕ ОБШИРНОГО ДЕФЕКТА
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

И. В. Гайович, С. С. Страфун, И. Ф. Лабунец*, Н. А. Утко*, С. И. Савосько**

Государственное учреждение “Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины”, 01601 Киев

* Государственное учреждение “Институт генетической и регенеративной медицины
НАМН Украины”, 04114 Киев

** Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца МЗ Украины, 01601 Киев

Аутопластика при повреждении нерва не всегда приводит к удовлетворительным результатам. Особенно важно это при обширных повреждениях нервов (более 10 см), когда за время прорастания аксонов к месту дистального шва происходит фиброз зоны дистального шва, что предотвращает дальнейшую регенерацию нерва и приводит к неудовлетворительным функциональным результатам. Целью работы было исследование влияния аспириата костного мозга и суспензии жировой ткани на регенерацию нервов при пластике обширных дефектов. 5 экспериментальных групп (2 контрольные, в первой нерв оставался неповрежденным, во второй проводилась только аутопластика дефекта). В третьей группе применялась аутопластика нерва и трансплантация жировой ткани; в 4 — пластика нерва с применением суспензии костного мозга, в 5 — пластика нерва с комбинированным применением клеточных суспензий. Через 1 и 3 мес животных выводили из эксперимента, а полученные пробы исследовали гистологически и морфометрически. Установлено достоверное положительное влияние применения клеточных технологий на регенерацию нерва, как на морфологическую структуру так и на биохимические процессы. Наиболее выраженные результаты были получены в группе, где применялась комбинация аспириата костного мозга и жировой ткани.

**STRUCTURAL AND METABOLIC BASES OF REGENERATION OF THE SCIATIC NERVE
IN PLASTIC OF LARGE DEFECT**

I. V. Gayovich, S. S. Strafun, *S. F. Labunets, *N. A. Utko, **S. I. Savosko

State institution “Institute of Traumatology and Orthopedics NAMS Ukraine”, 01601 Kyiv

*State Institution “Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine”, 04114, Kyiv

**National A. A. Bogomolets Medical University Ministry of Health Ukraine, 01601 Kyiv

Autoplasty after nerve injurie 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 it impossible to further regenerate of nerve and as a result- poor functional outcome. The aim of the study was to investigate the effect of bone marrow aspirate and fatty tissue suspension on regeneration of nerves, subject to the plasticity of large defects. 5 experimental groups (2 controls — in the first group nerve remained intact, in the second — only the autoplastics of the defect was carried out). In the third group an autoplasty of the nerve and transplantation of adipose tissue were used; in the 4-th — nerve plastics with application of bone marrow suspension; in the 5-th — nerve plastic with combined application of cell suspensions. After 1 and 3 months, the animals were excised from the experiment and the specimens were examined histologically and morphometrically. As a result of the research, a significant positive effect of the use of cell technologies on nerve regeneration, both on the morphological structure and on biochemical processes, was established. The best results were obtained in the group where the combination of bone marrow and adipose tissue was used.