

Gayovich I. V., Gayovich V. V., Makarenko A. N., Savosko S. I. Neurometabolic changes of peripheral nerve and muscle after traumatic injury and effect of autologous adipose tissue and bone marrow on regenerative processes after nerve plastic. ВІСНИК МОРСЬКОЇ МЕДИЦИНИ. 2018;1(78):74-83. ISSN 0049-6804.
DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1240753>
<http://www.herald.com.ua>

UDK 577.12:616.833-001-003.93-091.8

NEUROMETABOLIC CHANGES OF PERIPHERAL NERVE AND MUSCLE AFTER TRAUMATIC INJURY AND EFFECT OF AUTOLOGOUS ADIPOSE TISSUE AND BONE MARROW ON REGENERATIVE PROCESSES AFTER NERVE PLASTIC

Gayovich I. V., Gayovich V. V., Makarenko A. N., Savosko S. I.

Clinic of microsurgery and reconstructive surgery of the hand, Institute of Traumatology and Orthopedics NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine; Department of histology and embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine
e-mail: gajjgor@gmail.com.

Summary

Effectiveness of surgical recovery of peripheral nerve and muscle and biochemical disorders in denervated muscle after application of autologous suspension of adipose tissue and bone marrow has been analyzed in the article presented. The cell suspension was applied around the sciatic nerve graft, which created a favorable microenvironment for reparative processes. The criteria for evaluation of therapeutic intervention were: the level of sciatic nerve regeneration, the level of oxidative stress and antioxidant enzyme system. The results showed progressive oxidative stress in nerves and muscles after injury, disturbances of redox balance and cytoprotective enzyme systems. The use of cell suspensions suppressed metabolic disruption in muscle; activate compensatory mechanisms of cytoprotection and concomitant repair of tissues.

Key words: nerve graft, sciatic nerve, bone marrow suspension, adipose tissue suspension, metabolism.

НЕЙРОМЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ ПЕРИФЕРІЙНОГО НЕРВА ТА М'ЯЗІВ ПРИ ЇХ ТРАВМАТИЧНОМУ УШКОДЖЕННІ ТА ВПЛИВ АУТОЛОГІЧНОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ТА КІСТКОВОГО МОЗКУ НА РЕПАРАТИВНО-ВІДНОВНІ ПРОЦЕСИ ПРИ ПЛАСТИЦІ НЕРВА

I. В. Гайович, В. В. Гайович, О. М. Макаренко, С. І. Савосько

ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна;
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

Реферат. Досліджувалася залежність якості відновлення нерва при аутопластиці та вплив жирової тканини і кісткового мозку, що наносили навколо зони пластики на регенерацію нерва та денерваційні процеси м'язів. Застосування клітинних суспензій пригнічувало метаболічні порушення м'язів на етапі реіннервації, вповільнюючи дегенеративні процеси при денервації м'язу та забезпечували пришвидшення та покращення якості регенерації нерва.

Ключові слова: аутопластика, сідничий нерв, суспензія кісткового мозку, суспензія адипоцитів, метаболізм.

Реферат. Гайович И. В., Гайович В. В., Макаренко А. Н., Савосько С. И. НЕЙРОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА И МЫШЦ ПРИ ИХ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И КОСТНОГО МОЗГА НА РЕПАРАТИВНО - ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ПЛАСТИКЕ НЕРВА. В статье проанализирована зависимость уровня хирургического восстановления периферического

нерва и биохимических нарушений денервированных мышц при применении аутологичной суспензии жировой ткани и костного мозга. Клеточные суспензии наносили вокруг сегмента аутопластики седалищного нерва, что создавало благоприятную среду для репаративных процессов. Критериями оценки терапевтического воздействия были уровень регенерации седалищного нерва, уровень оксидативного стресса и показатели ферментов антиоксидантной системы. Результаты исследований подтвердили развитие окислительного стресса в нерве и мышцах после травмы, нарушения окислительно-восстановительного равновесия, ферментативной системы цитопротекции. Применение клеточных суспензий угнетало метаболические нарушения мышц на этапе реиннервации, активировало компенсаторные механизмы цитопротекции и сопутствующую репарацию тканей.

Ключевые слова: аутопластика, седалищный нерв, суспензия костного мозга, суспензия адипоцитов, метаболизм.

Вступ. Проблема відновлення великих дефектів нервів та функції м'язів кінцівки залишається не вирішеною [1]. Нажаль вдаль хірургічне відновлення ушкоджених нервів, особливо при застарілих ушкодженнях та великих дефектах нерва, не завжди дає бажаний результат і потребує досконалення терапевтичних та реабілітаційних заходів [2, 13]. Тривалий період відновлення нерва призводить до втрати м'язами скоротливої здатності, таким чином навіть після проростання нерва, скоротлива функція м'язів не відновлюється. Разом з тим, увага спеціалістів зосереджена лише на способах хірургічного відновлення нерва та симптоматичній медикаментозній терапії, а метаболічному підґрунті відновних процесів присвячені лише поодинокі фундаментальні наукові дослідження [4]. З метою цитотрофічної стимуляції репаративних процесів запропоновані різні аутологічні тканинні матеріали та суспензії клітин – плазми збагаченої тромбоцитами, суспензії жирової тканини і кісткового мозку [3, 14]. Перевагою таких технологій є зручність їх використання на хірургічному етапі, відсутність імунної агресії на клітинний матеріал і цитотрофічний вплив на тканини організму. **Мета дослідження:** вивчити дисметаболічні розлади нерва та м'язів при травматичному ушкодженні і відновних процесах при застосуванні аутологічних клітинних суспензій адипоцитів та кісткового мозку; дослідити вплив сучасних методик клітинної терапії на регенерацію нерва та денерваційні процеси в м'язах; покращити результати лікування пацієнтів з важкими ураженнями нервів.

Матеріали та методи

Методологія експерименту

Експерименти проведені на 25 кролях, вагою 3,2 - 3,5 кг. Тварини були розділені на 5 груп: 1) контрольна група (без ушкодження сідничого нерва); 2) дослідна група (пластика сідничого нерва); 3) аутопластика нерва і трансплантація жирової тканини; 4) пластика нерва з застосуванням суспензії кісткового мозку; 5) пластика нерва з комбінованим застосуванням клітинних суспензій. Тваринам наносили дефект сідничого нерва довжиною 1 см, здійснювали пластику виділеним сегментом нерва. Приготовану суспензію кісткового мозку наносили навколо сегмента пластики сідничого нерва. Премедикацію та знеболення дослідних тварин здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (i. p., 60 мг/кг). Експериментальні маніпуляції проводили відповідно до правил "Regulations on the Animals' Use in Biomedical Research", "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes", "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

Гістологічне дослідження

Через 1 місяць після проведеної операції тварин повторного наркотизували та здійснювали видалення і підготовку окремих сегментів травмованого сідничого нерва 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. Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) та мікроскопу Olympus BX 51 (Японія).

Біохімічне дослідження

Для оцінки метаболічних змін у дистальному сегменті сідничого нерва були проведені біохімічні дослідження про- та антиоксидантної системи. Для цього визначали активність

ферментів антиоксидантного профілю дії: глутатіонпероксидази (GPx), глутатіонредуктази (GR) та каталази, рівень вільний низькомолекулярних SH-груп. Про рівень оксидативного ушкодження свідчили концентрація ТБК - реагуючих продуктів, дієнових кон'югатів, карбонільних груп. Біохімічні показники визначали у супернатантах. Для цього фрагменти нерва гомогенізували і центрифугували при 10 000 g протягом 20 хв та досліджували спектрофотометричним методом з використанням спектрофотометра μ Quant, Bio-Tek, (США). Рівень загального білка визначали за методом Lowry [5]. Каталазну активність визначали за методом Aebi [6]. Концентрацію ТБК - активних продуктів визначали в гомогенатах за методом Uchiyama [7]. Вміст дієнових кон'югатів у вимірювали за методикою, описаною у статті Гаврилова В. Б. [8]. Визначення рівня низькомолекулярних SH-груп здійснювали за методом Елмана. Активність глутатіонпероксидази (GPx; номенклатура ферментів: EC 1.11.1.9) вимірювали за зменшенні рівня NADPH в сполученій глутатіонредуктазної (GR; номенклатура ферментів: EC 1.8.1.7) реакції [9]. Активність глутатіонредуктази (GR; номенклатура ферментів: EC 1.8.1.7) визначали. Ступінь окисної модифікації протеїнів (ОМП) оцінювали за вмістом карбонільних похідних протеїнів колориметричним методом [10].

Порівняння отриманих результатів здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Рівень статистичної значущості був встановлений на рівні $P < 0,05$.

Результати досліджень

У експерименті проведено співставлення та аналіз змін метаболічного профілю ушкодженого нерва та м'язів в залежності від протікання процесів регенерації нерва. Результати відновлення в контрольній групі корелювали згідно строків, швидкості та якості відновлення з відновленням великих дефектів (більше 10 см) у людини, оскільки 1 см дефекту у кроля відповідає приблизно 1/3 довжини стегна. Гістологічні дослідження підтвердили регенеративні процеси у зоні пластики нерва і у дистальних сегментах, проте ступінь відновлення нерва суттєво відрізнявся між групами порівняння. Так, у зоні трансплантату в усіх групах нервові волокна регенерували до дистального шва, а при застосуванні клітинних суспензій кількість осьових циліндрів був достовірно більшим в 2-2,5 рази. У дистальний сегмент ушкодженого нерва ознаки проростання фасцикул та репаративного відновлення зареєстровано лише у при застосуванні суспензії кісткового мозку (табл. 1)

Таблиця 1

Регенерація нервових сідничого нерва після аутопластики

Група/сегмент	Щільність нервових волокон, од/мм ³		
	Проксимальний	Аутопластика	Дистальний
Контроль	9601,0±285,5		
Травма	4895,1±331,7a	1501,0±121,1a	–
ТЖТ	6693,7±269,8a,b	3029,0±206,8a,b	–
ТКМ	7004,7±350,6a,b	3245,4±200,5a,b	851,9±54,3a,b
Комплекс	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 ($p < 0,05$)

Аналіз метаболічних змін полягав у оцінці змін маркерів енергетичного профілю, окиснювального стресу, прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. 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;
- 5) активність ДТ-діафори (NAD(P)H-хіноноксидоредуктази; номенклатура ферментів: EC 1.6.99.2) – ензим, який задіяний у відновленні хінонів;

6) активність глутатіонпероксидази (GPx; номенклатура ферментів: EC 1.11.1.9) - за участі глутатіону відновлює перекис водню до води;

7) активність глутатіонредуктази (GR; номенклатура ферментів: EC 1.8.1.7) – фермент, який відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону GSSG до його сульфгідрильної (метаболічно активної) форми GSH;

8) активність каталази (номенклатура ферментів: EC 1.11.1.6) – нейтралізує перекис водню;

9) загальний рівень білка – ступінь атрофічних, гіпотрофічних і дистрофічних змін органу.

Біохімічні дослідження засвідчили, що в ушкодженому нерві 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 ($p < 0,05$). Ці дані вказують на розвиток прогресуючого окиснювального стресу та ушкодження білкових і ліпідних компонентів клітинних структур ушкодженого нерва (табл. 2).

При трансплантації жирової тканини (ТЖТ) і кісткового мозку (ТКМ) 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 ушкодженому 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.

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). При застосуванні ТЖТ і ТКМ встановлено компенсаторну активацію GPx: активність ферменту зросла у 2,8 і 1,7 разів ($p < 0,05$).

Рівень активності GR у нерві 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 збільшилася у 2,8 разів ($p < 0,05$), а після ТКМ – у 2,1 рази ($p < 0,05$).

Активність каталази після аутопластики збільшилася у 2 рази ($p < 0,05$), що є компенсаторною реакцією у відповідь на прогресуючу продукцію ендogenous цитотоксичних метаболітів. Після ТЖТ і ТКМ встановлено зменшення активності каталази у 1,6 і 1,3 рази ($p < 0,05$), що є показником зменшення продукції перекису водню і, як наслідок, зменшення продукування самого ензиму, тобто відбувається репаративне відновлення ушкодженого нерва.

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, тобто відбувала виражена активація DT-діафрази під дією введення клітин червоного кісткового мозку. Тобто 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 ($p < 0,05$).

Метаболічний профіль денервованого скелетного м'язу мав схожі тенденції з відповідними показниками 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) 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.

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%

($p < 0,05$). 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-діафрази в обох випадках достовірно зменшилась в 2 і 3,5 разів, що також є проявом дистрофічних змін органу ($p < 0,05$). Отримані дані вказують на 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 ТЖТ 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 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.

Аналіз змін концентрації маркерів окиснювального стресу у скелетних м'язах кінцівки після аутопластики великого дефекту сідничого нерва та введення ТКМ засвідчив певні різниці впливу запропонованого способу корекції метаболічних розладів щодо ТЖТ. За загальним рівнем білка в зразках відмічено лише тенденцію щодо попередження гіпотрофічних змін м'язів, достовірної різниці на рівні стегна та гомілки із групою 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 зменшилась – 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 контролю, а активність каталази лише наближалась до контрольних показників. На рівні м'язів гомілки достовірної різниці щодо групи 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-діафори (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 окисативного 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 порівняння.

Аналіз результатів дослідження

Експериментальні дослідження дозволили порівняти та отримати залежність рівня регенерації ушкодженого нерва та метаболічних змін тривало денервованих м'язів. Встановлено, що вдале хірургічне відновлення нерва запобігає розвитку дисметаболічних порушень м'язів кінцівки і травмованого нерва. Разом з тим 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. При цьому застосування аутологічних тканинних продуктів – суспензії активованих адипоцитів та кісткового мозку – дозволяє активувати репаративні процеси, пришвидшити рівень відновлення нерва. Проте це не зупиняє розвиток окиснювального стресу і наступне перекисне окиснення структурних компонентів клітин (ліпідів плазматичних мембран, білків та нуклеопротейнів) і продукції цитотоксичних продуктів.

Найбільш інформативними показниками цих порушень є утворення дієнових кон'югатів (ДК) із окиснених поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), малонового діальдегіду (МДА) та поява карбонільних груп протеїнів, як наслідок окисної модифікації білків (ОМБ). Особливо легко окиснюються білки, що містять у своєму поліпептидному ланцюгу амінокислоти з SH-групами. В свою чергу вільні низькомолекулярні SH-групи, зокрема глутатіон, виконують роль ендогенних антиоксидантів і в гострій фазі травматичної хвороби нейтралізують вільні радикали. Так, глутатіонпероксидаза 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. Додатково до утилізації цитотоксичного перекису водню залучається каталаза, гіперактивність якої встановлено нами при травмі у нерві та м'язах, що вказує також на достатній рівень функціонування цитопротекторних механізмів.

Узагальнюючи результати досліджень метаболічного профілю ушкоджених органів кінцівки можна стверджувати про те, що головним біохімічним проявом та механізмом патологічних змін є порушення редокс-статусу тканин, який асоційований із енергетичним обміном, ішемією, запаленням та репаративним відновленням. Застосування за цих умов аутологічних клітинних суспензій дозволяє частково нейтралізувати патобіохімічні порушення та сприяти тканинному відновленню: ТЖТ нейтралізує ПОЛ, позитивно впливає на рівень утворення глутатіону, а застосування ТКМ додатково активує енергетичний обмін. За даними біохімічних досліджень можна стверджувати, що ТЖТ і ТКМ попереджає розвиток метаболічних порушень в денервованих м'язах, метаболічно підтримує м'яз на етапі реіннервації, активує компенсаторні механізми цитопротекції і супутню репарацію тканин. В порівняльному плані ТЖТ є потенційно більш перспективним аутологічним матеріалом, що може бути застосований з метою підтримки скелетного м'язу при травматичній хворобі периферійного нерва.

Висновки

1. Аутопластика периферійного нерва на даний момент є оптимальним методом заміщення дефекту нерва, який проте при великих дефектах забезпечує часткову регенерацію ушкодженого нерва і дозволяє запобігти гіпотрофічним змінам денервованих м'язів. Проявом метаболічних розладів при травмуванні нервів та м'язів є порушення окисно-відновної рівноваги, компенсаторна активація систем антиоксидантного захисту нерва та м'язів – каталази, системи обміну глутатіону.

2. Використання сучасних методів клітинної терапії має позитивний вплив на репаративні процеси ушкодженого нерва, запобігає гіпотрофічним змінам скелетних м'язів. Суспензія активованих адипоцитів на метаболічному рівні активує синтез глутатіону та ферментів його відновлення, забезпечує компенсацію DT-діафрази; суспензія клітин червоного кісткового мозку активує регенерацію ушкодженого нерва у дистальний відділ, частково активує систему захисту від оксидативного стресу, активує DT-діафразу та обмін глутатіону, забезпечує відновлення про-та антиоксидантної рівноваги, що запобігає дистрофічним змінам ушкоджених тканин.

3. Застосування аутологічних тканинних продуктів – суспензії активованих адипоцитів та кісткового мозку – дозволяє активувати репаративні процеси, пришвидшити рівень відновлення нерва, зменшити агресивність фіброзного рубця на рівні дистального шва та навколо нерва цим самим покращуючи трофіку та збільшуючи кількість нервових волокон, що проростають через дистальне місце шва.

4. Застосування технологій, що запропоновані, дозволяє за рахунок комплексного впливу на процеси запалення та регенерації знизити рівень денерваційних змін у м'язах, та покращити виживання м'язу на період денервації, що збільшує ймовірність ефективної реінервації за умови пластики великого дефекту.

5. Комбіноване застосування суспензії жирових клітин та мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку забезпечує найбільш оптимальну регенерацію нерва крізь сегмент аутопластики, формує навколо нерва жирову муфту, що попережує формування фіброзного рубця навколо нерву та покращує трофіку та умови для відновлення.

6. Комбінування клітинних технологій комплексно впливаючи на всі ланки регенерації активує нейролемоцити нерва, активує DT-діафразу та відновлює рівень глутатіону, тобто нейтралізує післятравматичне оксидативне ушкодження, майже елімінуючи перший етап раневого процесу та пришвидшуючи його.

7. В другому етапі раневого процесу велика кількість факторів росту та стовбурових клітин значно стимулює неоангіогенез в зоні ушкодження, знижуючи рівень ішемії, що є критичною для регенерації нерва.

8. Жирова тканина також виконує функцію механічного захисту шва, в той час як фактори росту та стовбурові клітини покращують її інтеграцію та в місці трансплантації формуючи нову ковзну систему нерва навколо місця травми.

Метаболічні зміни у дистальному фрагменті сіничого нерва після аутопластики

Група	Рівень продуктів перекисного окиснення			Вільні низькомолекулярні SH-групи, нмоль/мг протеїну	Рівень білка, мг/мл	Активність ферментів антиоксидантного профілю			Активність ензиму DT- діафрази, нмоль/мг/хв
	ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг протеїну	ДК, нмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну			Каталаза, нмоль/мг протеїну	GPx, нмоль/мг протеїну	GR, нмоль/мг протеїну	
Контроль	0,86±0,06	1,06±0,04	0,82±0,04	16,84±0,46	1,99±0,09	14,66±0,31	1,06±0,03	2,13±0,03	2,40±0,04
Травма	2,34±0,10 а	3,25±0,06 а	2,28±0,05 а	4,45±0,25 А	3,77±0,38 А	30,33±2,79 А	0,70±0,16 а	1,07±0,06 а	0,54±0,02 а
ТЖТ	1,13±0,07 а,b	2,16±0,10 а,b	1,54±0,09 а,b	8,69±0,25 а,b	2,98±0,22 а,b	18,65±1,82 а,b	2,00±0,36 а,b	3,07±0,59 b	0,67±0,03 а,b
ТКМ	1,97±0,04 а,b,c	2,35±0,04 а,b	1,80±0,09 а,b	7,02±0,38 а,b,c	3,03±0,33 а,b	22,38±1,13 а,b	1,24±0,03 а,b,c	2,33±0,02 b	1,77±0,04 а,b,c
Комплекс	1,44±0,07 а,b,c,d	2,20±0,09 а,b	1,65±0,08 а,b	11,86±0,45 а,b,c,d	2,88±0,46 а,b	22,84±1,75 а,b	1,45±0,06 а,b,e	2,27±0,14 b	1,94±0,23 b,c

Примітка: ТЖТ – трансплантація жирової тканини; ТКМ – трансплантація кісткового мозку; DT – дієнові кон'югати; GPx – глутатіон пероксидаза; GR – глутатіон редуктаза; а – 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)

Метаболічні зміни скелетних м'язів на тлі аутопластики сідничого нерва

Група	Рівень продуктів перекисного окиснення			Вільні низькомолекулярні SH-групи, нмоль/мг протеїну	Рівень білка, мг/мл	Активність ферментів антиоксидантного профілю			Активність ензиму DT- діафори,ази, нмоль/мг/хв
	ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг протеїну	ДК, нмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну			Каталаза, нмоль/мг протеїну	GPx, нмоль/мг протеїну	GR, нмоль/мг протеїну	
М'язи стегна в місці пластики									
Контроль	0,74±0,03	1,73±0,07	1,85±0,04	13,27±0,28	7,31±0,41	4,03±0,12	1,35±0,05	1,32±0,03	0,85±0,02
Травма	1,41±0,06a	3,51±0,06a	3,77±0,04a	7,48±0,21a	7,12±0,18	7,28±0,62a	2,22±0,07a	2,12±0,07a	0,41±0,08a
ТЖТ	0,99±0,03a,b	2,30±0,06a,b	3,19±0,12a,b	10,03±0,11a,b	7,94±0,16b	4,04±0,29b	1,40±0,05b	1,42±0,01a,b	0,80±0,07b
ТКМ	1,23±0,03a,b,c	2,63±0,03a,b,c	2,56±0,09a,b,c	10,34±0,17a,b	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	1,23±0,05a,b,c	2,21±0,04a,b	2,92±0,05a,b	10,63±0,34a,b,c	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	0,73±0,04	1,86±0,04	1,86±0,07	13,48±0,34	6,87±0,37	4,07±0,18	1,40±0,05	1,36±0,04	0,87±0,04
Травма	2,31±0,12a	4,71±0,18a	5,81±0,14a	4,65±0,36a	6,03±0,17a	10,34±0,40a	1,39±0,02	1,42±0,01	0,25±0,02a
ТЖТ	1,23±0,04a,b	3,15±0,13a,b	3,78±0,30a,b	7,5±0,31a,b	7,26±0,45b	12,15±0,31a,b	1,99±0,07a,b	2,19±0,04a,b	0,67±0,03b
ТКМ	1,80±0,09a,b,c	3,75±0,11a,b,c	4,31±0,20a,b	6,38±0,23a,b,c	6,36±0,14	9,74±0,03a,c	1,35±0,06c	1,40±0,01c	1,03±0,04b,c
Комплекс	1,74±0,10a,b,c	3,76±0,15a,b,c	3,73±0,20a,b	6,36±0,25a,b,c	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: ТЖТ – трансплантація жирової тканини; ТКМ – трансплантація кісткового мозку; DT – дієнічні кон'югати; GPx – глутатіон пероксидаза; GR – глутатіон редуктаза; 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)

Літератури / References:

1. Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts / H. Millesi // *Acta Neurochir.* – 2007. – Vol. 100. – P. 37-38.
2. 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.
3. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives / Alessandro Faroni, S. Atefeh Mobasseri, Paul J. Kingham, Adam J. Reid // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2015. – Vol. 82–83. – P. 160-167.
4. 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.
5. 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.
6. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // *Meth. Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126
7. M. Uchiyama, M. Mihara. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* – 1978. - Vol. 86(1). – P. 271-278.
8. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ–поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов /В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // *Лабор. дело.* – 1988. – № 2. – С. 60 – 63 [V. B. Gavrylov, A. R. Gavrylova, N. F. Hmara Measurement of diene conjugates in blood plasma by UV absorption of heptane and isopropanol extracts. // *Laboratory work.*– 1988. – № 2. – P. 60 – 63.
9. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82, № 1. – P. 70–77.
10. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. // *J. Clin. Med.* – 1967. – Vol. 70. – P. 158-169
11. Zaytseva O. V., Shandrenko S. G. Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups // *Ukr. Biokhim. Zhurn.* – 2012. – Vol. 84(5). – P. 112-116.
12. The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats / R. Mohammadi, S. Azizi, N. Delirezh, [et al.] // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* – 2012. – Vol. 41(5). – P. 650-656.
13. 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.
14. Angiogenesis induced by autologous whole bone marrow stem cells seeded on collagen scaffolds in silicone nerve tubes. An experimental study / Ahmad Farouk Abd El Azeem, Hatem Mostafa Hussin Al-Ahmady, Mustafa Ahmad Abdul Rahman, [et al.] // *Tanta Dental Journal.* – 2014. – Vol. 11, Issue 3. – P. 227–234.