

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ДУДЧЕНКО ЄВГЕНІЙ СЕРГІЙОВИЧ

УДК 616.718.5-003.9:616.379-008.64:616.15]-092.9(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО
ОСТЕОГЕНЕЗА ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ
(анатомо-експериментальне дослідження)**

222 – «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Дудченко Є. С.

Науковий керівник:

Ткач Геннадій Федорович, доктор медичних наук, професор

Суми – 2021

АНОТАЦІЯ

Дудченко Є. С. Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – «Медицина». – Сумський державний університет, Суми, 2021.

Сумський державний університет, Суми, 2021.

Дисертаційна робота присвячена визначенню морфологічних особливостей репаративного остеогенезу у щурів із хронічною гіперглікемією, а також з'ясуванню можливості застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові для корекції процесу репаративної регенерації довгої кістки щурів за умов впливу хронічної гіперглікемії.

Експериментальне дослідження було проведено на 380 білих лабораторних щурах – самцях зрілого віку, які були розподілені на чотири групи: I група – контрольна (120 щурів) із модельованим дірчастим дефектом діяфіза великогомілкової кістки; II група – 120 щурів із хронічною гіперглікемією та змодельованим дефектом діяфіза великогомілкової кістки; III група – 120 щурів, яким моделювали хронічну гіперглікемію, дірчастий дефект великогомілкової кістки та вводили у дефект збагачену тромбоцитами плазму; IV група – 20 тварин для оцінки стану глюкозного гомеостазу та підтвердження наявності гіперглікемії, у яких визначали вміст глюкози натще, інсуліну, глікозильованого гемоглобіну та С-пептиду в плазмі крові.

Хронічну гіперглікемію у тварин моделювали шляхом двотижневого навантаження 10 % водним розчином фруктози, одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину на цитратному буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг). На 60-ту добу після підтвердження хронічної гіперглікемії тваринам був змодельований дірчастий дефект діяфіза великогомілкової кістки.

Дослідження морфологічних особливостей остеогенезу проводили на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми, а визначення макро- та мікроелементів регенерату проводили на 3-тю та 30-ту добу. Для цього використовували мікроскопічний, ультрамікроскопічний, морфометричний, хіміко-аналітичний та статистичний методи. Світлову мікроскопію проводили з використанням мікроскопу Olympus BH-2 (Японія). Ультрамікроскопічне дослідження виконували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1230 (фірма JEOL, Японія) та растрового електронного мікроскопу «PEM 102» (Суми, Україна). Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою мікросітки, мікролінійки та з використанням обчислювальної програми «Digimizer». Вимірювали площу запального інфільтрату (мм^2), площу грануляційної тканини (мм^2), площу фіброретикулярної тканини (мм^2), площу ретикулофіброзної кісткової тканини (мм^2), площу хрящової тканини (мм^2). Хіміко-аналітичний аналіз проводили методами атомно-абсорбційної спектроскопії з електротермічною та полуменевою атомізацією. Статистичне опрацювання числових даних проводили за допомогою пакету програм SPSS (версія 17.0, США) та Microsoft Excel 2016.

Репаративний остеогенез у контрольних щурів характеризувався низкою послідовних стадій. На ранніх етапах процесу у регенераті відмічалися запальні зміни, формування посттравматичної гематоми, але вже на 14-ту добу дослідження їх не було виявлено. На 30-ту добу репаративного остеогенезу відбувалось інтенсивне ремоделювання ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту. Морфометричним аналізом було встановлено, що у кінці експерименту регенерат був утворений ретикулофіброзною та пластинчастою кістковою тканиною, площа яких склала $(84,44 \pm 1,03) \%$ від усієї зони остеорепарації. Для регенерату було характерне зменшення концентрації калію, натрію, заліза, магнію, цинку та міді, а для кальцію, навпаки, зростання вмісту в кінці експерименту, що пов'язано з утворенням морфологічно зрілої кісткової тканини.

Досліджено, що на ранніх стадіях репаративного остеогенезу хронічна гіперглікемія призводить до послаблення процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату, затримання розвитку грануляційної тканини. Затримка ліквідації запалення у місці кісткового дефекту призводить до зростання вмісту фіброретикулярної тканини та робить процес репаративного остеогенезу більш тривалішим. На пізніх стадіях остеорепації у тварин із хронічною гіперглікемією відзначалося порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату, внаслідок чого формування зрілої пластинчастої кістки у кінці експерименту не відбулося.

Морфометричним аналізом було виявлено, що кістковий регенерат на 21-шу добу у щурів із хронічною гіперглікемією ще містив ($4,52 \pm 0,67$) % запального інфільтрату, що підтверджує уповільнення процесу остеорепації. Лише на 30-ту добу ознак запалення у регенераті не було виявлено за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм. Окрім затримки регресії запального інфільтрату, на 21-шу добу остеорепації у кістковому регенераті тварин із хронічною гіперглікемією продовжувалася збільшуватися площа хрящової тканини (на 115,55 % ($p < 0,001$)) порівняно з попереднім терміном дослідження, але на 30-ту добу відбулося зменшення її площі, але лише на 40,66 % ($p < 0,001$) порівняно із 21-ою добою. У кінці експерименту площа ретикулофіброзної кісткової тканини у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією була меншою на 50,72 % ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи.

На початку остеогенезу за умов впливу хронічної гіперглікемії, у регенераті спостерігалось збільшення концентрації натрію на 115,78 % ($p < 0,001$), кальцію – на 46,42 % ($p = 0,013$), заліза – на 93,71 % ($p < 0,001$), цинку – на 62,99 % ($p < 0,001$) та міді – на 128,36 % ($p < 0,001$). У кінці експерименту спостерігалось зменшення концентрацій зазначених елементів, однак рівня контрольних показників вони не досягли. Вміст кальцію був менше на 17,92 % ($p = 0,001$) відповідно контрольної групи.

Встановлено, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми у щурів із хронічною гіперглікемією на ранніх стадіях репаративного остеогенезу, не призводить до значного пришвидшення елімінації кісткового та запального детриту. Разом з тим, на 7-му добу збільшувалась кількість остеобластів та остеокластів, а грануляційна тканина реорганізовувалася у фіброретикулярну сполучну тканину. Але все ж таки залишалися ознаки запалення. На 14-ту добу залишків кісткового детриту не було виявлено. Відбулось різке розростання фіброретикулярної тканини та її упорядкування й формування у остеїдні трабекули. Біля материнської кістки тяжі сполучної тканини були дифузно звапнілими по поверхні яких розміщувалися щільним пластом остеобласти та поодинокі остеокласти. У центрі дефекту утворення кісткових трабекул не спостерігалось, але відмічалася велика кількість капілярів синусоїдного типу. Хрящової тканини у регенераті на всіх термінах дослідження виявлено не було. Репаративний остеогенез проходив по типу остеобластичного диферону. Формування пластинчастої кістки з повноцінними остеонами було виявлено біля материнської кістки, у центрі регенерат складався з упорядкованої грубоволокнистої кісткової тканини.

Встановлено, що регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією, яким у дефект вводили збагачену тромбоцитами плазму, у кінці експерименту складався із ретикулофіброзної кісткової тканини, площа якої була більшою на 16,89 % ($p < 0,001$) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією та на 14,59 % ($p < 0,001$) менше порівняно із щурами контрольної групи.

Вміст натрію, кальцію, заліза та міді у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму на 3-тю добу остеогенезу зменшився на 37,47 % ($p < 0,001$), 22,21 % ($p = 0,115$), 33,66 % ($p < 0,001$) та 14,33 % ($p = 0,136$) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією без корекції. На 30-ту добу концентрація натрію була меншою на 25,98 % ($p < 0,001$), а міді на 29,74 % ($p = 0,001$) у регенераті тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму порівняно зі щурами із хронічною гіперглікемією без корекції. Достовірної різниці у

показниках вмісту калію, кальцію та магнію у регенератах щурів контрольної групи та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму виявлено не було. Концентрація заліза у регенераті тварин із групи корекції була більше на 19,48 % ($p = 0,005$) відповідно контрольного показника, однак достовірно не відрізнялася від групи щурів із хронічною гіперглікемією без застосування збагаченої тромбоцитами плазми.

Одержані результати показують, що за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм відбувається затримання ліквідації першої фази запалення у ділянці кісткового дефекту, що подовжує процес репаративного остеогенезу. Відбувається порушення проліферації та диференціації клітин остеобластичного диферону з формуванням фіброзно-хрящового регенерату. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми дає можливість коригувати негативний вплив хронічної гіперглікемії на репаративний остеогенез, а також сприяє швидшому звільненню від запального інфільтрату з місця дефекту кістки, формуванню остеогенного диферону та ремоделюванню грубоволокнистої кісткової тканини у повноцінну пластинчасту кістку, нормалізації макро- та мікроелементного складу регенерату.

Ключові слова: щури, репаративний остеогенез, великогомілкова кістка, хронічна гіперглікемія, збагачена тромбоцитами плазма.

ANNOTATION

Dudchenko Y.S. Morphofunctional features of reparative osteogenesis under conditions of chronic hyperglycemia (anatomical-experimental study). – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 222 – "Medicine". – Sumy State University, Sumy, 2021.

Sumy State University, Sumy, 2021.

The dissertation is devoted to the determination of morphological features of reparative osteogenesis in rats with chronic hyperglycemia, as well as to the possibility of using platelet-rich plasma to correct the process of reparative regeneration of long bone of rats under the influence of chronic hyperglycemia.

The experimental study was performed on 380 white laboratory male mature rats, which were divided into four groups: Group I – control (120 rats) with a simulated perforated defect of the tibia; Group II – 120 rats with chronic hyperglycemia and a simulated defect of the tibial diaphysis; Group III – 120 rats, which simulated chronic hyperglycemia, perforated defect of the tibia and injected into the defect platelet-rich plasma; Group IV – 20 animals to assess the state of glucose homeostasis and confirm the presence of hyperglycemia, which determined the content of fasting glucose, insulin, glycosylated hemoglobin and C-peptide in blood plasma.

Chronic hyperglycemia in animals was simulated by two weeks of watering with 10% aqueous fructose solution, a single intraperitoneal injection of streptozotocin on citrate buffer (buffer pH 4.5; dose of streptozotocin 40 mg / kg) and nicotinic acid (1 mg / kg). On the 60th day after confirmation of chronic hyperglycemia, the animals were simulated perforated defect of the tibia. Studies of morphological features of osteogenesis were performed on the 3rd, 7th, 14th, 21st and 30th days after injury, and the determination of macro- and microelements of the regenerate was performed on the 3rd and 30th days. Microscopic, ultramicroscopic, morphometric, chemical-analytical and statistical methods were used for this purpose. Light microscopy was performed using an Olympus BH-2 microscope (Japan). Ultramicroscopic examination was performed using a transmission electron microscope JEM-1230 (JEOL, Japan) and a scanning electron microscope «REM 102» (Sumy, Ukraine). Morphometric analysis was performed using a microgrid, a microline and using the computer program "Digimizer". The area of inflammatory infiltrate (mm²), the area of granulation tissue (mm²), the area of fibroreticular tissue (mm²), the area of reticulofibrous bone tissue (mm²), the area of cartilage tissue (mm²) were measured. Chemical-analytical analysis was performed

by atomic absorption spectrometry with electrothermal and flame atomization. Statistical processing of numerical data was performed using the software package SPSS (version 17.0, USA) and Microsoft Excel 2016.

It was found that reparative osteogenesis in rats without chronic hyperglycemia was characterized by timely change of all phases of regeneration. In the early stages of the process, inflammatory changes were observed in the regenerate, but on the 14th day of the study they were not detected. On the 30th day of reparative osteogenesis, intensive remodeling of reticulofibrous bone tissue into lamellar tissue took place. Morphometric analysis revealed that at the end of the experiment the regenerate was formed by reticulofibrous and lamellar bone tissue, the area of which was (84.44 ± 1.03) % of the entire area of osteoreparation.

It is investigated that in the early stages of reparative osteogenesis chronic hyperglycemia leads to a weakening of the reorganization of necrotic bone detritus and inflammatory infiltrate, delaying the development of granulation tissue. Delayed elimination of inflammation at the site of the bone defect leads to an increase in the content of fibroreticular tissue and makes the process of reparative osteogenesis longer. In the late stages of osteoreparation in animals with chronic hyperglycemia, there was a violation of the proliferation and differentiation of osteoblastic diferon towards the formation of fibrocartilage regenerate, resulting in the formation of mature lamellar bone at the end of the experiment did not occur.

It was studied that the early stages of reparative osteogenesis in rats with chronic hyperglycemia were characterized by a weakening of the reorganization of necrotic bone detritus and inflammatory infiltrate, delayed development of granulation tissue. There was a delay in the elimination of inflammation at the site of the bone defect, which makes the process of reparative osteogenesis longer. In the later stages of osteoreparation in animals with chronic hyperglycemia, there was a violation of the proliferation and differentiation of osteoblastic diferon in the direction of the formation of fibrocartilage regenerate. The formation of mature lamellar bone did not occur at the end of the experiment.

Morphometric analysis revealed that bone regenerate on the 21st day in rats with chronic hyperglycemia contained (4.52 ± 0.67) mm² inflammatory infiltrate, on

the 30th day in rats with chronic hyperglycemia no signs of inflammatory reaction in the regenerate . On the 21st day of the process of osteooperation in the bone regenerate of animals with chronic hyperglycemia, the area of cartilage increased by 115.55 % ($p < 0.001$) compared with the previous study period, but on the 30th day – decreased by 40.66 % ($p < 0.001$) compared with the 21st day. The area of reticulofibrous bone tissue in the regeneration of rats with chronic hyperglycemia was lower by 50.72 % ($p < 0.001$), respectively, the control group. Morphometric analysis revealed that bone regenerate on the 21st day in rats with chronic hyperglycemia still contained (4.52 ± 0.67)% of inflammatory infiltrate, which confirms the slowing of the osteoreparation process. Only on the 30th day, no signs of inflammation in the regenerate were detected under the influence of chronic hyperglycemia on the body. In addition to delayed regression of inflammatory infiltrate, on the 21st day of osteoreparation in the bone regenerate of animals with chronic hyperglycemia continued to increase the area of cartilage (by 115.55% ($p < 0.001$)) compared with the previous study period, but on the 30th day there was a decrease area, but only by 40.66% ($p < 0.001$) compared with the 21st day. At the end of the experiment, the area of reticulofibrous bone tissue in the regenerate of rats with chronic hyperglycemia was less by 50.72% ($p < 0.001$), respectively, the control group.

At the beginning of osteogenesis under the influence of chronic hyperglycemia, in the regenerate there was an increase in sodium concentration by 115.78 % ($p < 0.001$), calcium – by 46.42 % ($p = 0.013$), iron – by 93.71 % ($p < 0.001$), zinc – by 62.99 % ($p < 0.001$) and copper – by 128.36 % ($p < 0.001$). At the end of the experiment, a decrease in the concentrations of these elements was observed, but they did not reach the level of control indicators. The calcium content was less by 17.92 % ($p = 0.001$), respectively, the control group.

It was found that the use of platelet-rich plasma in rats with chronic hyperglycemia in the early stages of reparative osteogenesis does not significantly accelerate the elimination of bone and inflammatory detritus. At the same time, there was an increase in osteoblasts and osteoclasts, and the granulation tissue was reorganized into fibroreticular connective tissue. On the 14th day, no bone detritus residues were detected. There was a sharp growth of fibroreticular tissue and its ordering and formation into osteoid trabeculae. Near the maternal bone, the

connective tissue strands were diffusely calcified on the surface of which osteoblasts and single osteoclasts were placed in a dense layer. No bone trabeculae formation was observed at the center of the defect, but a large number of sinusoidal capillaries were observed. Cartilage tissue in the regenerate at all stages of the study was not detected. Reparative osteogenesis was of the osteoblastic diferon type. The formation of lamellar bone with full osteons was found near the maternal bone, in the center of the regenerate consisted of ordered coarse fibrous bone tissue.

It was found that the regenerate in rats with chronic hyperglycemia, which was introduced into the defect platelet-rich plasma, at the end of the experiment consisted of reticulofibrous bone tissue, the area of which was greater by 16.89 % ($p < 0.001$), respectively, animals with chronic hyperglycemia and 14.59 % ($p < 0.001$) less compared to control rats.

The content of sodium, calcium, iron and copper in the regenerate of rats with chronic hyperglycemia, which was injected with platelet-rich plasma on the 3rd day of osteogenesis decreased by 37.47 % ($p < 0.001$), 22.21 % ($p = 0.115$), 33, 66 % ($p < 0.001$) and 14.33% ($p = 0.136$), respectively, of animals with chronic hyperglycemia without correction. On the 30th day, the concentration of sodium was lower by 25.98% ($p < 0.001$) and copper by 29.74% ($p = 0.001$) in the regenerate of animals with chronic hyperglycemia, which was injected with platelet-enriched plasma compared to rats with chronic hyperglycemia without correction. There was no significant difference in potassium, calcium and magnesium levels in the regenerates of control rats and animals with chronic hyperglycemia treated with platelet-rich plasma. The concentration of iron in the regenerate of animals from the correction group was higher by 19.48% ($p = 0.005$) according to the control indicator, but did not differ significantly from the group of rats with chronic hyperglycemia without the use of platelet-rich plasma.

The obtained results show that under the influence of chronic hyperglycemia on the body there is a delay in the elimination of the first phase of inflammation in the area of the bone defect, which prolongs the process of reparative osteogenesis. There is a violation of proliferation and differentiation of osteoblastic diferon cells with the formation of fibrocartilage regenerate. The use of platelet-enriched plasma

makes it possible to correct the negative impact of chronic hyperglycemia on reparative osteogenesis, and also promotes faster release of inflammatory infiltrate from the site of the bone defect.

Key words: rats, reparative osteogenesis, tibia, chronic hyperglycemia, platelet-rich plasma.

Список публікацій здобувача

1. Dudchenko Y.S., Maksymova O.S., Pikaliuk V.S., Muravskiy D.V., Kyptenko L.I., Tkach G.F. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (IF – 2,052). (обліковується наукометричними базами Scopus та Web of Science) *(здобувач провів моделювання хронічної гіперглікемії, механічної травми, статистично обробив і проаналізував матеріал, підготував статтю до друку)*.

2. Ілляшенко В.Ю., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Ткаченко А.С., Дудченко Є.С., Тимошенко О.О., Дейнеко О.С. Спосіб комплексного визначення вмісту макро- і мікроелементів в органах лабораторних щурів у нормі і при патологічних процесах. Патент на корисну модель № 141361. МПК 2020.01. №и 2019 08297; заявл. 2019-07-16; опубл. 2020-04-10, Бюл. № 7 *(здобувач провів експеримент, аналіз результатів, написання та оформлення патенту)*.

3. Ілляшенко В.Ю., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Ткаченко А.С., Дудченко Є.С., Муравський Д.В., Дейнеко О.С. Препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент на корисну модель № 145726. МПК 2021.01. № и 2020 05430; заявл. 2020-08-21; опубл. 2020-12-28, Бюл. № 24 *(здобувач провів експеримент, аналіз результатів, написання та оформлення патенту)*.

4. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Муравський Д.В., Максимова О.С., Даниленко М.І. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045 *(здобувач провів моделювання хронічної гіперглікемії, механічної травми, статистично обробив і проаналізував матеріал, підготував статтю до друку).*

5. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737 *(здобувач провів моделювання хронічної гіперглікемії, механічної травми, статистично обробив і проаналізував матеріал, підготував статтю до друку).*

6. Дудченко Є.С. Особливості структурної організації регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№4(26):79-85. doi: 10.26693/jmbs05.04.079.

7. Tkach G., Maksymova O., Dudchenko Y., Illiashenko V., Tymoshenko A. The posttraumatic regeneration of long bone diaphysis in animals with chronic hyperglycemia. XXVI International Symposium on Morphological Sciences, Prague, July 5-7 2018. – P. 73-74.

8. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Годовас Д.В., Даниленко М.І. Хімічний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали другої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». м. Дніпро. 10-12 жовтня 2018 року. С. 58-59.

9. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Ілляшенко В.Ю., Максимова О.С. Макро- та мікроелементний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікроелементології»

присвяченій пам'яті академіка Ю. І. Кундієва, м.Київ, 4-5 жовтня 2018 року. С. 31-32.

10. Дудченко Є.С., Пастухова К.О., Сухонос О.В., Даниленко М.І., Літовченко Б.М. Особливості макро- та мікроелементного складу тканин скелетном'язової системи задньої кінцівки щурів зрілого віку у нормі. Матеріали II міжнародної науковопрактичної конференції «Сучасні наукові інновації», м. Київ, 24-25 лютого 2018 року (частина I). С. 41-42.

11. Dudchenko Y., Tkach G., Tymoshenko A., Tkachenko A., Maksymova O. Scanning electron microscopy analyses of bone posttraumatic regeneration in animals with chronic hyperglycemia. Матеріали тез доповідей VII конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України, м. Одеса, 2-4 жовтня 2019 року. С. 200.

12. Дудченко Є.С., Сікора В.З., Ткач Г.Ф. Структурні особливості регенерата довгих трубчастих кісток скелета при хронічній гіперглікемії організму та спрямованій остеотропній терапії збагаченої тромбоцитами плазми. Наукова-практична конференція «Актуальні питання сучасної морфології» присвячена 100-річчю з дня народження професора Олександра Гавриловича Яхницьі та 65-річчю з дня народження професора Миколи Анатолійовича Волошина, м. Запоріжжя, 3-4 жовтня 2020 року. С. 55-56

ЗМІСТ

	С
Перелік умовних скорочень	15
Вступ	16
Розділ 1 Огляд літератури	22
1.1 Сучасні погляди на особливості репаративного остеогенезу	22
1.2 Вплив хронічної гіперглікемії на морфологічні особливості репаративного остеогенезу	31
1.3 Корекція репаративного остеогенезу плазмою збагаченою тромбоцитами	35
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	43
2.1 Загальна характеристика експериментальної моделі	43
2.2 Методи дослідження	49
Розділ 3 Результати власних досліджень	53
3.1 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза довгих кісток скелета контрольної групи тварин	53
3.2 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза довгих кісток скелета щурів за умов хронічної гіперглікемії	69
3.3 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза довгих кісток скелета щурів за умов хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми	86
Розділ 4 Аналіз та узагальнення результатів власних досліджень	108
Висновки	123
Список використаних джерел	126
Додатки	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ХГ – хронічна гіперглікемія
- ЦД – цукровий діабет
- ЗТП – збагачена тромбоцитами плазми
- PRP – збагачена тромбоцитами плазми
- НК – природних кілерів
- МСК – мезенхімальні стовбурові клітини
- MSCs – мезенхімальні стовбурові клітини
- ЕКП – ендотеліальних клітин-попередників *in situ*
- IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту-1
- IFN- γ – інтерферон гамма
- TNF- α – фактор некрозу пухлини-альфа
- FGF – фактор росту фібробластів
- PDGF – фактор росту тромбоцитів
- TGF- β – бета-трансформуючий фактор росту
- BMP – білки кісткового морфогенезу
- Cox1 – циклооксигеназа-1
- Cox2 – циклооксигеназа-2
- VEGF – фактора росту ендотелію
- IL – інтерлейкін
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- NAD⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотид
- СТЗ – стрептозотоцин
- NO – оксид азоту (II)

ВСТУП

У зв'язку з розвитком урбанізації та механізацією життя травматизм стає важливою соціально-економічною проблемою. Відповідно до даних світової статистики травми займають друге місце серед причин тимчасової непрацездатності, третє місце серед причин інвалідності та летальності [1]. Так за прогнозами Diana Lopes та співавторів кількість переломів кісток скелета в США може збільшитися з 2,1 мільйона випадків (згідно 2018 р.) до 3-х мільйонів випадків, які очікуються у 2025 році. А у Європі щорічна кількість переломів зросте на 28 % до 2025 року (з 3,5 до 4,5 мільйонів) [2]. Крім того, проблема регенерації кістки має особливе значення у зв'язку з необхідністю тривалого та високовартісного лікування та медичної реабілітації [3, 4].

Цілісний аналіз остеогенезу після переломів та інших пошкоджень, пошук та обґрунтоване застосування засобів, які впливають на регенерацію кістки, можливі на підставі поглиблених знань загальних закономірностей остеорепарації, а також реактивних змін кісткової тканини у процесі регенерації. Крім того, актуальність даного питання зростає з ростом супутньої патології такої, як ЦД, ожиріння, інші ендокринні та метаболічні порушення, хвороби нирок, захворювання серцево-судинної системи [5, 6, 7].

Поряд із цим, за даними ВООЗ, в усьому світі близько 422 мільйонів осіб страждають на ЦД, а до 2045 року експерти прогнозують зростання захворюваності на ЦД до 629 млн, що становить велику соціально-економічну проблему [8].

Вважається, що тривалий вплив гіперглікемії призводить до зміни метаболізму кісток та порушення їх мікроструктури через різноманітні механізми на молекулярному та структурному рівнях. Зокрема, відомо, що на фоні ЦД пригнічуються процеси ремоделювання кісток [9], у них накопичуються кінцеві продукти глікації [10], спотворюється реакція на гормональні сигнали та відбувається розвиток мікросудинних ускладнень [11].

Аналізуючи статистичні дані, звіти ВООЗ та дані літератури ми відмітили, що існує потреба у розробці нових та ефективних методів лікування переломів кісток. Застосування різноманітних новітніх медичних технологій значно покращують процеси загоєння переломів, проте кількість ускладнень залишається на високому рівні, особливо у людей із метаболічними порушеннями. Так, приблизно у 5-10 % всіх випадків при переломі кісток спостерігається сповільнення консолідації, що може призвести до незрощення відламків, а частота формування хибних суглобів коливається від 8 до 17 % [12, 13].

Незадовільні наслідки регенерації кісток, що негативно впливають на функцію опорно-рухового апарату, їх висока поширеність та труднощі під час відповідного лікування, особливо у людей із хронічною гіперглікемією, вимагають глибокого розуміння процесів остеогенезу та подальшого пошуку ефективних, доступних способів його корекції.

Зв'язок роботи з науковими програмами планами, темами

Дисертаційна робота виконана згідно з планом наукових досліджень Сумського державного університету і є складовою частиною науково-дослідної теми кафедри морфології і кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології з держбюджетним фінансуванням «Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії» (номер державної реєстрації 0117U003926).

Мета – визначення морфологічних особливостей репаративного остеогенезу у щурів із хронічною гіперглікемією, а також з'ясування можливості застосування збагаченої тромбоцитами плазми для корекції репаративної регенерації великогомілкової кістки щурів за умов впливу хронічної гіперглікемії.

Завдання дослідження

1. Визначити мікро-, ультраструктурні та морфометричні закономірності репаративного остеогенезу та особливості хімічного складу кісткового

регенерату великогомілкової кістки контрольних тварин для подальшого проведення порівняльного аналізу отриманих даних.

2. Вивчити морфологічні характеристики репаративного остеогенезу великогомілкової кістки щурів за умов впливу хронічної гіперглікемії.

3. Дослідити морфометричні особливості регенерату великогомілкової кістки щурів за умов впливу хронічної гіперглікемії.

4. З'ясувати особливості хімічного складу кісткового регенерату щурів за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії на ранній та пізній стадії репаративного остеогенезу.

5. Вивчити можливість корекції негативного впливу хронічної гіперглікемії на репаративну регенерацію великогомілкової кістки збагаченою тромбоцитами плазмою.

Об'єкт дослідження – репаративний остеогенез великогомілкової кістки щурів-самців у різні фази остеогенезу за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії.

Предмет дослідження – морфологічні особливості перебігу репаративного остеогенезу за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії, хімічний склад кісткового регенерату щурів у різні фази остеогенезу.

Методи дослідження: біохімічний, мікроскопічний, ультрамікроскопічний, морфометричний, хіміко-аналітичний, статистичний.

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше на значній кількості експериментального матеріалу, сучасними методами морфологічного та хіміко-аналітичного аналізів доведено, що стрептозотонін-індукована хронічна гіперглікемія чинить негативний вплив на процес репаративного остеогенезу щурів після механічної травми великогомілкової кістки.

Встановлено, що хронічна гіперглікемія призводить до затримання всіх фаз репаративного остеогенезу. Відбувається послаблення процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату. Порушується проліферація та диференціація остеобластичного диферону в бік

формування фіброзно-хрящового регенерату, без формування зрілої пластинчастої кістки у кінці експерименту.

З'ясовано, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми пришвидшує елімінацію кісткового та запального детриту у місці дефекту великогомілкової кістки, реорганізацію фіброретикулярної сполучної тканини у ретикулофіброзну та пластинчасту кісткову тканину, запобігає утворенню хрящової тканини у регенераті. Репаративний остеогенез проходить по типу остеобластичного диферону.

Практичне значення одержаних результатів

Виконане дослідження дає змогу розширити знання про репаративний остеогенез довгих кісток скелета за умов впливу негативних чинників, у тому числі за умов впливу хронічної гіперглікемії. Встановлено ефективність застосування збагаченої тромбоцитами плазми для нівелювання негативного впливу хронічної гіперглікемії на репаративний остеогенез, що дає підставу пропонувати використовувати збагачену тромбоцитами плазму для покращення процесів остеорепарації в осіб із хронічною гіперглікемією.

Одержані результати дослідження впроваджено у навчальний та науковий процес морфологічних кафедр: кафедри анатомії людини імені М. Г. Туркевича Буковинського державного медичного університету; кафедри анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії Буковинського державного медичного університету; кафедри клінічної анатомії та оперативної хірургії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова; кафедри анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»; кафедри медико – біологічних дисциплін Національного університету фізичного виховання і спорту України м. Київ; кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького; кафедри анатомії, клінічної анатомії, оперативної хірургії, патоморфології та судової медицини Чорноморського національного університету ім. Петра Могили м. Миколаїв; кафедри нормальної та

патологічної клінічної анатомії Одеського національного медичного університету; кафедри патологічної анатомії людини з секційним курсом Української медичної стоматологічної академії м. Полтава; кафедри анатомії людини Харківського національного медичного університету.

Особистий внесок дисертанта

Дисертантом проведений інформаційний пошук та аналіз даних літератури, власноруч виконані всі етапи експериментального дослідження, реалізоване мікро- та ультраструктурне дослідження, морфометричне, статистичне опрацювання та аналіз одержаних результатів, самостійно проведене узагальнення результатів дослідження, підготовлені праці до друку та сформульовані висновки з дисертації.

Апробація результатів дисертації

Основні результати дисертації представлені та обговорені на XXVI Міжнародному симпозиумі з морфологічних наук (Чехія, м. Прага, 2018), на другій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 2018), на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікроелементології» присвяченій пам'яті академіка Ю. І. Кундієва (м.Київ, 2018), на II міжнародній науковопрактичній конференції «Сучасні наукові інновації» (м. Київ, 2018), на VII конгресі наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України (м. Одеса, 2019), на науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної морфології» присвяченій 100-річчю з дня народження професора О. Г. Яхницької та 65-річчю з дня народження професора М. А. Волошина, (м. Запоріжжя, 2020).

Публікації

Основний зміст дисертаційної роботи викладений у 12 наукових працях, з яких 3 статей у фахових наукових журналах, 1 стаття в журналі, що обліковується наукометричними базами Scopus та Web of Science, 2 патенти на корисну модель України та 6 тез доповідей у матеріалах симпозиумів і конференцій. Одна наукова праця опублікована одноосібно.

Обсяг і структура дисертації

Дисертацію викладено українською мовою на 165 сторінках. Робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, з підрозділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел. Список використаної літератури налічує 228 найменування (42 – кирилицею і 186 – латиницею). Робота ілюстрована 13 таблицями та 77 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасні погляди на особливості репаративного остеогенезу

Кістка – це динамічний орган, форма та структура якого змінюється протягом людського життя [14]. Відомо, що функція скелета пов'язана з підтримкою ваги та стійкості, захистом внутрішніх органів від пошкоджень, забезпеченням рухових процесів у тісному взаємозв'язку з м'язовою тканиною [15, 16]. Крім цього, кістка – відповідає за кровотворення, приймає участь у мінеральному метаболізмі та є важливим компонентом імунної системи [17, 18].

Кісткова тканина (КТ) представляє поліморфну систему, яка складається з клітин, органічного та мінерального матриксу, у якій протягом життя людини відбуваються два взаємопов'язані процеси, що складають цикл ремоделювання – резорбція або руйнування старої тканини та остеогенез – кісткоутворення [19]. Утворення нової кістки здійснюється завдяки остеобластам, які синтезуючи матрикс органу перетворюються у зрілу клітину – остеоцит, що забезпечує життєдіяльність кістки і підтримує мінеральний обмін [20-22]. Остеоцити – це клітини, які здатні трансформувати механічні стимули у біохімічні сигнали. Зрілі остеоцити мають незначну здібність до резорбції кісткової тканини, так як містять фосфатазу та пептидазу [22].

У резорбції кістки беруть участь остеокласти. Вони – є клітинами не кісткового походження, а послідовниками моноцитів та макрофагів [18, 23].

Функціонування остеобластів та остеокластів регулюється гормонами та біологічно активними речовинами. Важливу роль у роботі цих клітин відіграють гормони, які регулюють обмін кальцію в організмі – кальцитонін та паратгормон [24].

Репаративна регенерація – це процес відновлення морфологічних структур після їх ушкодження чи будь-яких патологічних процесів. Механізми

фізіологічної та репаративної регенерації якісно єдині та здійснюються на основі загальних закономірностей [25].

R. Dimitrion та E. Jones вважають, що репаративна регенерація кістки – це складний, добре організований процес формування, який можна спостерігати під час нормального загоєння кісткового дефекту, та, який бере участь у безперервному ремоделюванні кістки протягом усього життя [26].

За думкою F. Loі та співавторів, кістка має чудовий потенціал до регенерації, має здатність до повного відновлення навіть великих за довжиною дефектів, завдяки високому ступеню васкуляризації [27].

Рубленко М. В. та колеги стверджують, що процеси кісткової репарації супроводжується значними гіперкоагуляційними розладами у системі гемостазу у вигляді різного ступеня розвитку коагулопатій, порушенням функціональності ендотелію та зниженням синтезу оксиду азоту, що негативно впливає на утворення судин та відновлення кістки [28].

Важливим специфічним маркером репаративного остеогенезу є кістковий ізофермент лужної фосфатази, який здатний генерувати позаклітинний неорганічний фосфат. Рівень лужної фосфатази у сироватці крові відображає метаболізм остеобластів, при цьому її концентрації корелюють із рівнем формування кістки [29-31].

Крім лужної фосфатази, функцію остеобластів можна визначити за чутливим показником ремоделювання кісткової тканини – остеокальциніном – неколагеновим білком кістки, який бере участь у процесі зв'язування кальцію і гідроксилапатиту з колагеном, сприяючи організації кісткового матриксу [32].

Репаративна регенерація може бути повною та неповною. Повна регенерація або реституція характеризується заміщенням дефекту тканиною, повністю ідентичною зруйнованій. Неповна репаративна регенерація чи субституція – дефект заміщується щільною волокнистою сполучною тканиною – рубцем [33].

Відповідно до сучасних уявлень, регенерація кістки – це багатофазний механізм клітинних та молекулярних реакцій, які призводять до утворення у

ділянці перелому кісткової тканини, ідентичної початковій. Процес поділяють на стадії, кожен з яких контролюють певні локальні та системні фактори. Дослідники зауважують, що розподіл на стадії певною мірою є умовним, тому що окремі послідовні явища не співпадають у часі в різних зонах регенерату [34]. На думку В. В. Поворознюка та співавторів, репаративний остеогенез є складним та багатоетапним процесом [35]. А. Т. Бруско та В. Г. Гайко на основі системних спостережень та оцінці багаточисленних клінічних та експериментальних досліджень над динамікою зрощень кісткових уламків визначили фазність та стадійність репаративного остеогенезу [36].

А. І. Волотовський та Ю. Г. Шапошніков виділяють 4 стадії консолідації перелому: 1 – стадія альтерації або стадія гострого запалення при ушкодженні; 2 – формування тимчасового матриксу; 3 – утворення ретикулофіброзної кісткової тканини (прямий остеогенез) або хрящової тканини (вторинний остеогенез); 4 – формування та дозрівання грубоволокнистої кісткової тканини; 5 – ремоделювання кістки [37, 39].

Інші автори стверджують, що процес репаративного остеогенезу протікає в три фази: 1 – фаза ранніх посттравматичних змін; 2 – фаза регенерації; 3 – фаза функціональної адаптації [38].

Більш детально стадійність репаративного остеогенезу демонструють Котельніков Г. П. та Миронов С. П. [40]:

Rebecca Redfern та Charlotte A. Roberts вважають, що найтривалішою за часом є фаза ремоделювання (70 %), а найкоротшою – репаративна (10 % часу) [41].

На думку D. Lopes та співавторів провідне місце у процесі репаративного остеогенезу займають мезенхімальні стовбурові клітини (mesenchymal stem cells – MSCs), які надходять в ділянку пошкодження з кісткового мозку, навколишніх м'яких тканин, системи кровообігу та диференціюються за хондрогенним і остеогенним шляхами [2, 42]. Наявний потенціал

диференціювання дозволяє МСК брати участь у регенерації не тільки місцево, але і мігрувати по кровоносній системі в осередок пошкодження [43].

Фріденштейн та його колеги першими продемонстрували наявність у кістковому мозку стовбурових клітин, схожих на фібробласти, які були пластичними та здатними диференціюватися на множинні фенотипи. Клітини, подібні до фібробластів, пізніше називали МСК або стромальними клітинами кісткового мозку [44]. Colton С. у своїх експериментальних дослідженнях продемонстрував доказові факти, що вказують на походження МСК саме з окістя, ендоста та кісткового мозку і він впевнений, що саме ці клітини є основними елементами, які сприяють консолідації перелому [45].

Морфогенез КТ відбувається завдяки функціональній активності спеціальних кісткових клітин – остеобластів, що синтезують і секретують остеοїдні речовини, мінералізація яких призводить до формування грубоволокнистої кісткової тканини і так званого первинного кісткового зрощення, що з'єднує кісткові уламки. Надалі грубоволокниста кісткова тканина в процесі фізіологічної перебудови розсмоктується остеокластами і заміщується завдяки функціональній активності остеобластів кістковою тканиною [46].

Як відомо, на остеогенну диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин впливають фактори, що секретуються остеобластами та остеοцитами [47, 48].

Відновлення кісток після переломів або травм здійснюється шляхом прямого або непрямого зрощення [13, 49].

Непряме (вторинне) зрощення виникає після резорбції остеокластами нежиттєздатних ділянок трабекул і остенів, характерне для складних осколкових переломів, за наявності значної відстані, незначних мікрорухів між кістковими уламками, наявністю великих гематом, некротичних змін у навколишніх тканинах, пізнім розвитком ангіогенезу та грануляцій. У цих

випадках репаративний остеогенез проходить у ряд послідовних стадій і супроводжується формуванням фіброзно-хрящового регенерату [37, 50].

Сьогодні вчені розглядають цілий ряд чинників здатних пригнічувати перебіг кісткової регенерації і умовно розділяють їх на місцеві та загальні [51-53].

Безсмертний Ю. О. та Шевчук В. І. вважають, що порушення репаративного остеогенезу довгих кісток, які призводять до формування хибних суглобів, пов'язані з метаболічними порушеннями, а саме: гіпергомоцистеїнемією, атерогенними дисліпідеміями, високими рівнями медіаторів запалення, дисбалансом у системі оксиду азоту [54].

Для підтримання повної функціональності кісткової тканини в організмі людини існує система механізмів, яка гарантує її цілісність. Цей процес відбувається завдяки послідовним етапам відновлення: запалення, утворення м'якої мозолі, формування твердої мозолі, ремоделювання [55-57].

Регенерація кісток значною мірою залежить від успішної запальної реакції, реваскуляризації місця травми, секреції остеогенних та хондрогенних факторів, реконструкції позаклітинного матриксу в межах пошкодженої та нової кісткової тканини [45].

Корж Н. А. та Дєдх Н. В., спираючись на висновки власних досліджень, виділяють п'ять стадій репаративного процесу: запалення, диференціювання клітин і формування тканиноспецифічних структур у зоні перелому, реорганізація тканинних структур і мінералізація, ремоделювання кістки і останній, це завершення процесу відновлення [46].

Під час перелому кістки відбувається пошкодження всіх морфологічних структур, які оточують зону перелому [58-60].

Через свій ангіогенетичний та остеогенетичний потенціали формування гематоми на ранніх стадіях загоєння є неодмінним кроком для подальшої успішної регенерації вважає Р. Kolar та співавтори. Оскільки утворена гематома в ділянці перелому є джерелом постачання остеогенних клітин та факторів росту, які стимулюють формування кісткової тканини [42, 61, 62].

О. К. Попсуйшапка та співавтори прийшли до висновку, що запальний процес є неспецифічним біологічним інструментом, який супроводжує регенерацію тканин, і є максимально вираженим на початку, а з часом його активність знижується [34].

Наслідком перелому є порушення періостального, кортикального та медулярного судинного живлення, що призводить до некрозу та ацидозу [63].

У ділянці пошкодження розлади місцевої мікроциркуляції спричинюють виникнення деструктивно-некротичних процесів навколишніх тканин, що підсилюють процеси запалення. Фактор гіпоксії – Hif1 α індукує експресію транскрипції ангіогенних факторів, які відіграють провідну роль у процесі неоваскуляризації кісткового регенерату. Судинні морфогенетичні білки або ангіопоетини впливають на формування нових судин, що живлять регенерат. Особливе значення має судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), який безпосередньо призводить до реваскуляризації ділянки регенерації, яка є необхідною умовою етапу відновлення [64-66]. VEGF здійснює стимуляцію репаративного остеогенеза за рахунок проліферації і диференціювання перицитів судинної стінки в остеобластичні клітини, а також за рахунок вираженого впливу на клітини остеобластичного дифферона [67].

Процеси загоєння перелому взаємопов'язані та скоординовані з неоваскулогенезом. Формування судинної мережі відбувається за допомогою двох різних механізмів: ангіогенезу та васкулогенезу [68]. Кількість циркулюючих ендотеліальних клітин попередників (ЕКП) збільшується у пацієнтів у перші три дні після перелому [69].

Згідно з даними G. Vaht та B. Alman репаративний остеогенез об'єднує фізіологічні реакції, які спираються на численні механізми, що контролюють процеси проліферації, диференціації і активації гемопоетичних та мезенхімальних клітин. На думку авторів імунні клітини, які походять від гемопоетичних стовбурових клітин, необхідні для нормального розвитку кісток і правильного загоєння переломів [70, 71].

Макрофаги та нейтрофіли, які знаходяться у ділянці дефекту продукують цитокіни і фактори росту (включаючи фактор некрозу пухлин-альфа (TNF-а), прозапальні цитокіни: IL-1, IL-6, IL-11 та IL-18), що стимулюють міграцію мезенхімальних стромальних клітин в місце пошкодження, де вони проліферують та диференціюються, таким чином сприяючи ревазуляризації та утворенню грануляційної тканини [72-73].

Супутні захворювання, старіння, ЦД та паління, також впливають на затримку процесів репаративного остеогенезу, ймовірно, через вади судин [74].

Інші протизапальні фактори також мають важливе значення для консолідації переломів. Наприклад, у щурів, яким не вистачає гена, що кодує рецептор альфа (TNF-альфа) пухлинного фактора, мають значну затримку початку диференціації хондроцитів, та затримку окостеніння [75].

Інтерлейкін-6 також залучений до процесу загоєння кісток. Генетична абляція IL-6 у мишей порушує загоєння через затримку мінералізації регенерату, дозрівання та перетворення на кістку [76].

Крім забезпечення запальними цитокінами, імунні клітини також виробляють фактори росту, такі як фактори росту фібробластів (FGF), фактор росту тромбоцитів (PDGF) та бета-трансформуючий фактор росту (TGF-beta), які ініціюють процес відновлення шляхом активації проліферації та диференціювання стовбурових клітин, які сприяють консолідації перелому [77].

Потужними стимуляторами репаративного остеогенезу є фактори росту. До них відносять кісткові морфогенетичні протеїни трансформуючі фактори росту, тромбоцитарний фактор росту, фактор росту фібробластів, інсуліноподібний фактор росту, диференціюючий фактор. Проте найбільш сильними остеоіндукторами, які забезпечують диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин в остеобласти є кісткові морфогенетичні білки [78, 79], які здатні викликати мітогенез мезенхімальних стовбурових клітин та їх диференціацію, зв'язувати компоненти кісткового матриксу та активувати синтез колагену [80].

У місці перелому також присутні інші типи імунних клітин, моноцити та клітини природні кілери (NK). Ці клітини продукують цитокіни, які відповідають за активацію інших клітин з диференціацією та проліфераційним потенціалом для регенерації тканини (наприклад, остеопрогенітарні MSC). Коли остеопрогеніторні клітини набираються до місця перелому, їх остеогенна диференціація частково індукується імунними клітинами, присутніми в місці пошкодження. Т-лімфоцити також є частиною регенеративного процесу: вони діють, пригнічуючи процес загоєння за допомогою дії цитокінів IFN- γ та TNF- α [62, 81, 82, 83].

У стадії формування м'якої кісткової мозолі відбувається заміщення гематоми грануляційною тканиною багатою на фібрин, шляхом міграції та проліферації мезенхімальних клітин, їх диференціювання до хондроцитів (в напрямку кісткового та хрящового диферонів), а також за рахунок деградації формених елементів крові [34, 84, 85].

Часово хондрогенна диференціація клітин-попередників регенерату тісно узгоджується з роздільною здатністю протизапальної відповіді і відбувається на фібриновому каркасі, який сформувався у складі гематоми. Просторово хондрогенез відбувається головним чином у зоні перелому, з періостальних стовбурових клітин, які є головним джерелом хондроцитів [45].

У своїх дослідженнях Gerstenfeld L. C. та співавтори визначили активність проліферації клітин камбіального шару кісткової тканини в складі стромы кісткового мозку, остеогенних клітин періосту, остеонів і ендосту. Дослідники впевнені, що найшвидше процеси ділення протікають у клітинах глибокого шару окістя, яке знаходиться в ділянці дефекту. Результатом активного ділення цих клітин є формування періостальної частини кісткової мозолі [57, 86].

Репаративний остеогенез – це багатостадійний процес, у якому важливу роль відіграє інтенсивність кровопостачання [87-88].

Процес ремоделювання починається із залучення остеобластів, які приєднуються до матриксу кісткової тканини. Поруч з ними знаходяться

остеокласти, які оточують краї пошкодженої кістки. Вони створюють ізольоване мікросередовище, окислюють і розчиняють органічні та неорганічні речовини кісткової тканини [89-91].

Новоутворена первинна кістка поступово заміщується вторинною, в процесі кісткового ремоделювання остеоцити зазнають апоптозу і нормальна фізіологія кістки відновлюється, досягаючи повної функціональності як і до перелому [84, 93, 94]. За оцінками, від 60 % до 80 % клітин, які брали участь в процесі репаративного остеогенезу гинуть від апоптозу [21].

За думкою М. В. Рубленко та С. А. Семеняк, консолідація перелому – це складний біологічний процес, який проходить низку послідовних стадій і завершується формуванням в зоні фрактури кісткової тканини ідентичної тій, що існувала до пошкодження завдяки клітинному типу регенерації [97].

На думку О. О. Левченка взаємозв'язки між клітинними елементами в кортикальній і трабекулярній кістковій тканині відрізняються та мають відмінності морфологічного характеру [92].

Процеси ремоделювання у трабекулярній кістці протікають значно активніше, за рахунок переваги площі над об'ємом і є подібними до тих, які відбуваються в кортикальній кістці. Новоутворена кісткова тканина називається трабекулярний остеон або геміостеон [98, 99].

Інші автори стверджують, що успішність репаративного остеогенезу залежить від розвитку ангиогенезу [95, 96]. Через затримку механізмів утворення судин сповільнюється процес загоєння. Це пояснюється зменшенням кількості та зниженням функції мезенхімальних стовбурових клітин і низькою ефективністю ендотеліальних клітин-попередників [100].

На думку А. Т. Бруска і Г. В. Гайко в умовах компенсованих посттравматичних циркуляторних розладів кровопостачання відбувається формування кісткового диферона – пулу кісткових клітин, що складається в першу чергу з клітинних елементів остеобластичного типу, синтетична і секреторна активність яких забезпечує остеогенез, відновлення кісткової тканини і, в кінцевому рахунку, загоєння перелому [101].

Підводячи підсумки, можна сказати, що процес репаративного остеогенезу посідає важливе місце в галузі медико-біологічних дисциплін. Фундаментальні дослідження, які проводяться останнім часом дають можливість уявити по-новому процеси репаративного остеогенезу, визначити особливості консолідації переломів, порівняти відмінності регенерації, зрозуміти біологічні механізми загоєння.

1.2 Вплив хронічної гіперглікемії на морфологічні особливості репаративного остеогенезу

Всесвітня організація охорони здоров'я повідомляє, що близько 422 мільйонів людей у всьому світі страждають на ЦД. За інформацією Міжнародної федерації діабету поширеність цієї хвороби на сьогодні становить 425 млн. випадків. Експерти очікують зростання захворюваності на ЦД до 629 млн. у 2045 року [8].

Відомо, що ЦД 1-го типу зумовлений руйнуванням β -клітин підшлункової залози аутоімунним механізмом, обумовленим дією тригерних чинників у осіб з генетичною схильністю. Приблизно 10% хворих мають діабет 1-го типу. ЦД 2-го типу виникає за рахунок поступового порушення секреції інсуліну в умовах інсулінорезистентності і на нього страждає близько 90% пацієнтів[114].

ЦД впливає на кісткову систему через порушення метаболізму глюкози, з яким безпосередньо пов'язаний процес проліферації остеобластів, запевняє В. Leska – Czernik та однодумці [115].

Дослідження останніх років доводять, що ЦД має негативний вплив на опорно-руховий апарат. Amy Creesy та співавтори вважають, що ризик перелому зростає в міру прогресування хронічної гіперглікемії (ХГ) [116, 117].

Sadighi A. разом з колегами, повідомляють про високий відсоток (від 8 до 32%) пошкодження процесів репаративного остеогенезу в умовах ЦД 2-го типу, а також про те, що гіперглікемія призводить до зменшення проліферації та

диференціації клітин хрящового та остеобластичного диферонів, які беруть участь у регенерації [118].

Сироджов К. Х. та інші доводять результатами своїх досліджень, що при ЦД відбуваються зміни процесу ремоделювання кісткової тканини, так як інсулін безпосередньо впливає на синтез колагену і лужної фосфатази [119, 120].

Обмінні процеси в кістковій тканині пацієнтів з ЦД 2-го типу протікають з меншою інтенсивністю, порівняно зі здоровими особами. У дослідженнях виявлено зниження рівня остеокальцину в сироватці крові пацієнтів з ЦД 2-го типу, а також С-кінцевого телопептиду колагену 1 типу і підвищення вмісту кісткової лужної фосфатази [121, 122].

На думку Carlos Marin та співавторів ХГ чинить негативний вплив на репаративні процеси кісткової тканини. В даний час є дані, що дозволяють стверджувати про те, що клітинні та молекулярні механізми загоєння кістки після перелому порушуються [123].

Крім того високий рівень глюкози в крові здатний змінювати кістковий матрикс і знижувати його якість. Важливо відмітити, що умови гіперглікемії погіршують диференціацію остеобластів та мінералізацію кісток, а також впливають на зниження рівня сироваткового вмісту VEGF, що в свою чергу призводить до погіршення реваскуляризації в запальну фазу консолідації переломів [123, 124].

Крім того в сироватці крові у хворих з діабетом другого типу виявлено підвищення рівня експресії запального білка макрофагів 1-а, який потенційно розширює активність остеокластів під час загоєння кісток, тим самим порушує процеси регенерації [125].

До причин, що порушують відновлення кісткової тканини при ЦД відносять порушення глікозилювання в умовах гіперглікемії. Діабетична полінейропатія може призвести до посилення процесу резорбції кістки, а мікро- та макроангіопатія – порушує кровопостачання кісток [114, 126, 127, 128].

На думку Ялочкиної Т. О. та Пигарової Е. А. важливу роль в загоєнні кістки при ЦД відіграє інсулін. Дослідники з'ясували, що у крис з нелікованим ЦД рівень синтезу колагену в зоні перелому знижувався на 50-55%, що призводило до погіршення механічних властивостей новоутвореної тканини [121].

Н. В. Дедух та А. А. Сикал в експериментальних дослідженнях з'ясували, що на фоні змодельованого ЦД у тварин в ділянці регенерату відзначалась підвищена щільність остеокластів, зростання площі хондроїда та порушення заміщення хрящової тканини кістковою, за рахунок зниження проліферації та диференціації клітин, порушення процесів ангиогенезу, утворення колагену та глікозаміногліканів [129].

Brown M. L. та співавтори доводять, що за умов ХГ, виявлено порушення утворення кісткової тканини в ділянці перелому за рахунок зниження проліферації та диференціації остеобластів, які впливають на синтез факторів росту [74].

Більшість авторів стверджують, що ХГ викликає зниження щільності кісткової тканини, призводить до розвитку остеопенії, що в свою чергу негативно впливає на процеси консолідації переломів, сприяє підвищенню ризику переломів та є фактором, який ускладнює процеси репаративного остеогенезу [130, 131].

В експериментальних моделях на тваринах, які мають підвищений рівень глюкози в крові, виявлено знижену кількість колагену, протеогліканів, кальцію, магнію, остеокальцину [132].

Гіперглікемія порушує клітинну взаємодію під час запальної фази, погіршує дію циркулюючих факторів росту та ендокринних гормонів [133, 134].

У пацієнтів з цукровим діабетом знижується кісткоутворення та збереження кісткової маси у молодому віці, тоді як у дорослому житті гіперглікемія призводить до посилення резорбції кісток [135, 136].

З досвіду клінічних випадків відомо, що у хворих на ЦД загоєння переломів більш триваліший за часом процес, ніж у пацієнтів з нормальними

показниками глюкози у крові [137, 138]. На даний час темою наукових дискусій є те, що ЦД порушує гомеостаз кістки [139, 140].

Відомо, що за умов гіперглікемії збільшується продукування факторів RANK, RANKL, ФНП-а, TRAIL, які призводять до збільшення кількості остеокластів в тканинах та їх активацію, в наслідок чого відбувається посилення резорбції кісткової тканини та її руйнування [141, 142].

Більшість авторів стверджують, що у тварин з ЦД погіршується мікроциркуляція і знижується щільність судин у кістковій тканині та зоні регенерату, що призводить до зменшення здатності кістки до відновлення [123, 143, 144].

На думку Thrailkill K. та Bunn R. C., скелет осіб, що страждають на ЦД, морфологічно погіршується, оскільки характеризується зниженням мінеральної щільності та дефіцитом структурних елементів кісток, підвищеним ризиком переломів [145].

Загальновідомим є той факт, що при поєднаній дії таких факторів як ХГ та недостатності кальцію в організмі, значно порушується мікроархітектоніка кісткової тканини. До дефіциту кальцію призводить поліурія, обумовлена ЦД. А також внаслідок зниження рівня інсуліну відбувається дефіцит активних метаболітів вітаміну Д, що у свою чергу призводить до порушення процесів всмоктування кальцію в кишківнику, посилення секреції і активності паратиреоїдного гормону та посилює резорбцію кісткової тканини [146].

Інсулін – анаболічний гормон, який діє на кісткову тканину через його рецептори (IRS-1 та IRS-2). Інсулін збільшує проліферацію остеобластів і сприяє синтезу колагену. Таким же чином, фактор росту-1 інсуліну (IGF-1) діє на збільшення набору остеобластів і відкладення кісткового матриксу та зменшення деградації колагену [140-147].

Також з'ясовано, що за умови ХГ знижується рівень цитокінів та хемокінів, які синтезуються макрофагами, фібробластами, ендотеліальними клітинами і тромбоцитами, що призводить до зниження інтенсивності механізмів запалення у зоні перелому [148].

Абсолютний дефіцит інсуліну знижує синтез остеобластами колагену та лужної фосфатази, зменшується також стимуляція остеобластів, опосередкована інсуліноподібними та іншими чинниками росту й цитокінами вважають Я.О.Близнюк та М. Л. Кирилюк [142].

Додатковим підходом для визначення впливу гіперглікемії на кістковий метаболізм є оцінка сироваткових маркерів кісткового циклу, зокрема такого показника як рівень остеокальцину та аміно-кінцевого пропептиду проколагену типу 1, які знижуються у пацієнтів, що страждають на ЦД [149].

Сикал А. А., Дедух Н. В. зазначають, що у тварин з ЦД виявлено зниження щільності остеонів, порушено їх якісну конструкцію. Лінія, що розділяє материнську кістку та регенерат мала неструктурований аморфний вигляд, були присутні тріщини і щілини. Дослідники виявили, що ремоделювання кісткової тканини у тварин з ЦД порушено за рахунок підвищення лакун резорбції не заповнених остеобластами і макрофагами. В осередках резорбції, зафіксовано, підвищену щільність остеокластів [150].

Івченко А. В. вважає, що ЦД хоч і є патологією ендокринної системи, все ж таки це захворювання супроводжується змінами усіх життєво важливих органів і систем, в тому числі, і кісткової. В експериментальних дослідження гістологічні результати демонструють порушення процесів оссіфікації у тварин з ЦД та можливість їх корекції при застосуванні інсуліну. Але при лікуванні діафізарних переломів довгих кісток кінцівок у хворих на ЦД впливу лише одного інсуліну, з метою усунення порушень відновлення кісткової тканини, недостатньо [151].

Підсумовуючи вище сказане, стає зрозуміло, що ХГ призводить до зменшення проліферації та диференціації клітин хрящового та остеобластичного диферонів. ЦД впливає на кісткову систему через порушення метаболізму глюкози. Беззаперечним є необхідність подальших досліджень та розширення знань в процесах репаративного остеогенезу в умовах ХГ.

1.3 Корекція репаративного остеогенезу плазмою збагаченою тромбоцитами

Кісткова тканина (КТ) людини в нормі має високу здатність до відновлення, проте в багатьох випадках процеси регенерації не можуть бути в повній мірі реалізовані. У зв'язку з цим виникає необхідність з'ясувати вплив остеоіндуктивних матеріалів на процеси регенерації КТ. Основним завданням є пошук адекватного репаративного субстрату, шляхи його впровадження в ділянку пошкодженої кістки. Таким агентом може виступати збагачена тромбоцитами плазма, отримана з власної крові пацієнта [152].

Розробка методів з використанням клітинних та тканинних технологій дозволяють домогтися поєднання таких факторів, як біосумісність, біодеградація і біоактивність [153-155].

В останні роки аутологічні концентрати тромбоцитів широко використовуються для регенерації тканин у кількох галузях медицини, таких як ортопедія, спортивна медицина, стоматологія та щелепно-лицева хірургія, офтальмологія, пластична та серцева хірургія [154].

У даного методу є певні переваги: відсутність алергічної реакції, запобігання інфікуванню, так як, використовується власна кров; відсутність побічних ефектів і системної дії на організм – впливу на печінку, нирки та інші органи; мінімальна кількість можливих ускладнень, а також перевагами збагаченої тромбоцитами плазми (*Platelet rich plasma* – PRP) є швидкість і простота її отримання [156-159].

Проблема відновлення дефектів кістки після завданих ушкоджень є однією з найдавніших в медичній науці, незважаючи на її багатовікову історію, залишається до кінця не вирішеною до сьогоднішнього дня. Спроби дослідників створити умови для відновлення кісткової тканини і її структури поки що не завжди вдається реалізувати. Важлива роль в процесі репарації і регенерації кісткової та інших пошкоджених тканин відводиться тромбоцитам [160-162].

На сьогоднішній день ще більшої популярності зазнають фактори росту, які застосовуються в клінічній практиці для стимуляції та активації процесів відновлення різних пошкоджених і травмованих тканин. Прикладом такого засобу може бути PRP [163].

PRP містить високу концентрацію тромбоцитів у малому об'ємі плазми. Вона містить фактори росту, які відіграють певну роль під час початкової фази загоєння та регенерації кісток [164].

Основними факторами росту, що беруть участь у регенерації кісток, є речовини, які містяться в гранулах тромбоцитів (тромбоцитарний фактор росту – PDGF), трансформуючий фактор росту бета – TGF- β , інсуліноподібний фактор росту-1 – IGF-1 та епідермальний фактор росту – EGF [165-167].

Platelet derived growth factor – тромбоцитарний фактор росту найактивніший в фазу запалення і стимулює дію інших факторів росту (IGF-1), а також він впливає на процеси проліферації та диференціації клітин, стимулює синтез колагену під час ремоделювання кістки. Fibroblast growth factor (GFs), – фактори росту фібробластів стимулює проліферацію фібробластів та синтез міжклітинного матриксу, особливо колагену III типу, що важливо саме на ранніх етапах загоєння. Insulin growth factor – інсуліноподібний фактор росту I типу впливає на репаративно-відновні процеси, як безпосередньо активують міграцію та проліферацію фібробластів на ранніх стадіях консолідації, так і регулюючи дію інших факторів росту. Vascular endothelial growth factor – група факторів росту ендотелію судин, що необхідний для неоваскуляризації на початковій стадії загоєння [168, 169, 170, 174].

PRP отримують центрифугуванням аутологічної крові хворих. Результатом цього центрифугування є велика концентрація тромбоцитів у малому об'ємі плазми. У ній міститься значна кількість цитокінів, які здатні регулювати процеси в першій фазі консолідації, притягуючи в зону перелому імунні клітини, підсилюючи їх адгезію до ендотеліоцитів. Крім цього цитокіни беруть участь у перебудові КТ, стимулюють розвиток запалення, сприяють диференціюванню клітин попередників [163, 164, 170].

Препарати PRP використовуються з початку 1990-х років, і їх клінічні переваги спочатку повідомлялися при щелепно-лицьових операціях та в стоматології, однак посилення розвитку фармацевтичної галузі, спортивної

медицини, травматизму, призвело до популяризації цих методів лікування [171].

Тромбоцити, які містяться у PRP, руйнуючись в кістковому дефекті, виділяють численні фактори росту, які запускають і активізують процеси остеогенезу [172].

Гайович І. Є. умовно поділяє фактори росту на ті, що мають переважно стимулюючий ефект на процеси міграції, проліферації та диференціації клітин та синтезу міжклітинного матриксу (VEGF, TGF- β , FGF) та ті, що володіють переважно регулюючою дією на інші фактори росту (IGF-1 та PDGF) [175].

Під час активації (дегрануляції) тромбоцитів виділяється велика частина біологічно активних речовин, що містяться в гранулах. Для того, щоб активувати тромбоцити та вивільнити а-гранули необхідні певні речовини активатори до яких відносять: міжклітинний кальцій, тромбін, кальцію хлорид, колаген [166].

В організмі людини тромбоцити виконують дві основні функції – зупиняють кровотечу (гемостаз) та стимулюють процеси загоєння травмованих тканин. Крім цього, тромбоцити впливають на протимікробний захист та ангіогенез. Життєвий цикл цих клітин триває близько 10 днів, після чого старі тромбоцити руйнуються макрофагами, а на їх місце приходять новоутворені [167, 176-178].

Підходи до лікування пошкоджень і захворювань опорно-рухового апарату за останні роки значно змінилися. У теперішній час впровадженню використання PRP, що демонструє значний вплив на результати лікування. Відповідно до уявлень більшості сучасних авторів, застосування PRP – це простий, дешевий і мінімально інвазивний спосіб отримання природної концентрації аутологічних факторів росту, тому в даний час широко проводяться експерименти в різних областях медицини для виявлення її здатності прискорювати відновлення тканини з низьким регенеративним потенціалом. Доступність, простота методу і його ефективність

відкривають перспективи його більш широкого використання в клінічній медицині [179, 180].

Бур'янов О. А. та співавтори зазначають, що при використанні аутогенної кісткової тканини та фібрину збагаченому тромбоцитами, в регенераті відмічається хаотичне розміщення кісткових трабекул та їх різна зрілість. На поверхні кісткових трабекул щільність остеобластів була нерівномірною. В регенераті проміжки між кістковими балками заповнювали кровоносні судини. Тут же знайдено фіброретикулярну тканину з великою кількістю клітин фібробластичного диферону. Кісткова тканина, що складає регенерат, має певні відмінності від материнської: висока щільність остеоцитів, які мають базофільні ядра з цитоплазмою невеликого об'єму. Ці клітини розміщувалися в лакунах, що засвідчує відсутність остеоцитарного остеолізу [181].

Після проведення PRP-терапії відмічається: поліпшення кровообігу в ділянці ураженого суглоба; усунення спазму м'язів, що оточують суглоб; прискорення відновлення пошкодженої тканини як за рахунок біологічно активних речовин, що регулюють цей процес, так і за рахунок постачання його необхідними компонентами; прискорення реабілітації після травми [182].

Варес Я. Е. та Сліпий В. З. вважають, що PRP є сучасною унікальною регенеративною технологією, яка покращує раннє відновлення кісткових ран, сприяє адаптації кісткових трансплантатів та забезпечує більш швидке формування кісткової тканини. Аутологічність препарату, біологічна сумісність, безпечність, низька собівартість та технологічна простота приготування дозволяють систематичне використання у хірургічній та ортопедичній практиці [183].

У теперішній час в науковій літературі зустрічається велика кількість даних про біологічні ефекти PRP, зокрема її впливу на репаративний остеогенез. В експериментальних дослідженнях *in vitro* було продемонстровано, що PRP збільшує ендогенну секрецію гіалуронової кислоти синовіальними фібробластами. У експериментах *in vivo* показано, що введення PRP у зону перелому прискорює формування КТ. В дослідях на

тваринах встановлено, що застосування PRP прискорює остеогенез і ремоделювання [184, 185].

PRP у своєму складі містить два основні компоненти: волокнистий та клітинний, які значно впливають на процеси регенерації кісткової тканини. На думку В. Л. Брехова, використання такої плазми покращує процеси репаративного остео- і хондрогенезу, поліпшуючи результати оперативного лікування хворих із дефектами кісткової та хрящової тканин, зменшує кількість реостеосинтезів у 7 разів і призводить до скорочення термінів непрацездатності на 15 % [186].

На думку Климовицького В. Г. і Соловйова І. А., використання плазми, збагаченої тромбоцитами, в лікуванні ушкоджень КТ дозволяє прискорити терміни загоєння в результаті впливу її на патофізіологічні процеси репаративної регенерації. Будучи ендogenous речовиною, плазма зменшує ризик побічних ефектів як місцевого, так і центрального характеру. Її використання дозволяє знизити кількість незадовільних результатів і скоротити терміни лікування [182].

Відомо, що тромбоцити впливають на КТ при хронічних розладах наприклад, старечому остеопорозі та гострих станах наприклад, переломі. Ці клітини посилюють регенерацію кісток, сприяючи міграції та проліферації остеогенних клітин, збільшуючи утворення кровоносних судин та індукуючи запальні реакції [187]. Загальновідомим є той факт, що застосування PRP може сприяти процесу загоєння рани, перелому кісток або дефекту кісткової тканини. Також, спроби застосування PRP в клінічній практиці для прискорення загоєння діабетичних виразок стопи демонструють позитивні результати [167, 188, 189].

Аналізуючи велику кількість літератури, відзначаємо, що існує досить широкий спектр назв PRP. В різних джерелах можна зустріти такі їх варіанти : «тромбоцитарний концентрат», «тромбоцитарний гель» або «тромбоцитарна суспензія» [190-192].

У 2009 році David M. Dohan Ehrenfest спробував створити першу класифікацію PRP, в основі якої лежать особливості технологій приготування

даного препарату. Дослідник розділив PRP на чисту – P-PRP, що не містить лейкоцитів, та лейкоцитарну L-PRP, а також чисту плазму збагачену тромбоцитами і фібрином, який, в свою чергу, поділяється на чисту та лейкоцитарну pure platelet-rich fibrin (P- PRF) та leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) [193]. З часом дослідники намагалися удосконалити та розширити класифікацію плазми збагаченої тромбоцитами. У 2011 році А. Mishra розробив структурний розподіл даного препарату, що об'єднує в себе показники концентрації тромбоцитів, фракції лейкоцитів та застосування активаторів [194]. Jeffrey M. DeLong у 2012 році запропонував класифікацію, що включає ступінь концентрації тромбоцитів, диференціює наявність нейтрофілів у фракції лейкоцитів. Такий розподіл необхідний для розуміння застосування та наслідків використання тієї чи іншої фракції [195].

Велика кількість вітчизняних дослідників застосовують PRP при багатоосколкових і внутрішньосуглобових переломах. Доведено, що PRP має здатність фіксувати вільні фрагменти пошкодженого хряща з субхондральною кісткою, що дозволило уникнути їх видалення. Результати проведених досліджень демонструють позитивний ефект від застосування плазми збагаченої тромбоцитами в лікуванні пошкоджень опорно-рухового апарату. У більшості робіт, опублікованих останнім часом, автори впевнено констатували збільшення швидкості утворення нової кістки і поліпшення її якості при використанні PRP [180, 196-199].

У клінічній практиці застосування PRP у вигляді ін'єкцій у хворих з ушкодженнями плечової кістки, в ділянку пошкодження в більшості випадків наступило повна регенерація а також відмічалось зникнення больового синдрому в спокої і значне зменшення його при навантаженні [200].

Знеболювальна дія PRP можлива за рахунок дегрануляції специфічних пептидів протезних рецепторів активними тромбоцитами. В літературі наведені дані про високу ефективність лікування больового синдрому плазмою збагаченою тромбоцитами при місцевому застосуванні. Ін'єкції PRP покращують ангіогенез та сприяють утворенню м'якої мозолі [201].

Дослідження демонструють позитивний ефект від застосування PRP в лікуванні ушкоджень м'яких і кісткових тканин. Так, дослідники провели якісне дослідження, присвячене використанню PRP в комбінації з кістковим матеріалом. Вчені довели збільшення швидкості процесів регенерації кісткової тканини, поліпшення її якості при використанні плазми, збагаченої тромбоцитами. Аутологічні кісткові трансплантати в поєднанні з PRP показали позитивні результати у прискоренні регенерації кісток на тваринних моделях [202].

За умови нормального перебігу консолидації перелому, при введенні PRP шляхом ін'єкції менше виражена набряклість у пошкоджених тканинах, менше проявляються ознаки гострого і хронічного запалення, фаза альтерації швидше змінюється регенераторно-репаративними процесами. Використання PRP для прискорення репарації кістки і м'яких тканин нині стало одним із напрямів у реконструктивно-відновлювальній хірургії вважає Д. В. Івченко і В. В. Мірошніков [203].

Отже, можна сказати, що PRP є джерелом великої кількості біологічно активних речовин і володіє потужним репаративним потенціалом. Однак реалізація цього потенціалу сильно варіює залежно від способу використання даного препарату. Кількість і співвідношення факторів тромбоцитів відіграють критичну роль в реалізації репаративного потенціалу PRP, в тому числі при остеогенезі. Поряд з розробкою нових типів біотрансплантатів і тканинних інженерних конструкцій важливим завданням залишається вдосконалення методів аналізу та оцінки біологічних властивостей тромбоцитів людини [204].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальна характеристика експериментальної моделі

Експериментальне дослідження проведено на 380 білих лабораторних щурах – самцях зрілого віку – 7 – 9 місяців з масою тіла 180-220 г.

Комісією з питань дотримання біоетики при проведенні експериментальних та клінічних досліджень медичного інституту Сумського державного університету (протокол № 1/3 від 9 березня 2021 р.) встановлено, що під час проведення дослідних робіт норми етики і моралі порушені не були, експеримент був виконаний відповідно чинних нормативних документів.

Перед початком експерименту усі тварини були оглянуті на предмет їх рухової активності та стану зовнішніх покривів. Після цього щури підлягали двотижневій карантинізації. Піддослідні тварини доглядалися в умовах віварію Медичного інституту Сумського державного університету відповідно до загальноприйнятих рекомендацій, вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами («Правила проведення робіт з використанням експериментальних тварин», додаток 4, затверджений наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1997 р. «Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин»; «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.); правила, затвержені комісією з питань біоетики Медичного інституту Сумського державного університету (протокол № 4 від 22 грудня 2009 р.; Хельсинська декларація Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000); положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Щури знаходились у кімнаті віварію за умов сталої температури (24-25°C), вологості ($60 \pm 5\%$) та за умов 12-годинного циклу зміни темряви та

освітлення. Щоденно тварини отримували питну воду та сухий гранульований корм зі збалансованим вмістом необхідних для повноцінної життєдіяльності інгредієнтів.

Для досягнення поставленої мети та виконання окреслених задач всіх щурів було поділено на чотири групи (табл. 2.1). До складу першої (I) групи (контрольна група) входило 120 щурів, які утримувались в умовах нормального харчового та питного раціону. Поточне прибирання кліток виконувалося щоденно. Тваринам цієї групи моделювали дефект діафіза великогомілкової кістки. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах і під кетаміновим наркозом. Перед операцією тваринам внутрішньом'язово вводили спочатку ксилазин (3 мг/кг) (Алфасан (Нідерланди)), а через 5 хвилин – кетамін (8 мг/кг) (ПАТ «Фармак», Україна). Передопераційну підготовку операційного поля проводили шляхом виголювання шерстяного покриву в ділянці передньої поверхні гомілки та тричі обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. Робили розріз завдовжки 0,8 – 1,5 см по лінії *margo anterior tibiae*. За допомогою портативної зуботехнічної бормашини стерильним бором діаметром (d 1,6 мм) при малих обертах з охолодженням у середній третині діафіза лівої великогомілкової кістки формували отвір до кістковомозкового каналу. Операційну рану закривали шкірним швом, який обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. Упродовж наступних 3 діб після операції для профілактики гнійних ускладнень післяопераційний шов обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. У тварин даної групи кістковий дефект залишали загоюватися під кров'яним згустком, а для знеболювання внутрішньом'язово вводили кетанов (кеторолак) дозою 0,2 мг двічі на добу. Тварин з експерименту виводили шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг / 100 г маси тіла) (Корпорація «Артеріум», Україна): на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми по 20 щурів для гістологічного та ультрамікроскопічного дослідження; по 10 щурів із групи на 3-тю та 30-ту добу для хіміко-аналітичного аналізу

використовуючи препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин, на який отримано патент на корисну модель [104].

До складу другої (II) групи (група з хронічною гіперглікемією) входило 120 щурів, яким моделювали хронічну гіперглікемію. Для цього протягом двох тижнів піддослідні щури замість питної води вживали 10 % водний розчин фруктози. Після цього кожному щуру було одноразово виконане внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину («Sigma-Aldrich», США) на цитратному буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг) (ФК «Здоров'я», Україна).

Таблиця 2.1

Розподіл тварин за групами та термінами експерименту

Група тварин	Термін експерименту та кількість тварин					Разом
	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба	30 доба	
I група (n = 120)	30	20	20	20	30	120
II група (n = 120)	30	20	20	20	30	120
III група (n = 120)	30	20	20	20	30	120
Група тварин контролю гіперглікемії						
IV група (n = 10)	20					20
<i>Загальна кількість тварин</i>						<i>380</i>

З метою дотримання «чистоти» експерименту щурам контрольної групи була зроблена одноразова внутрішньоочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буферу. Після введення стрептозотоцину тварини знаходились у звичайних умовах віварію на звичайному харчовому та питному раціоні протягом 60 діб. Після досягнення цього терміну, тваринам даної групи моделювали дефект лівої великогомілкової кістки аналогічно контрольної

групи. Виводили тварин шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг / 100 г маси тіла): на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми по 20 щурів для гістологічного та ультрамікроскопічного дослідження; по 10 щурів із групи на 3-тю та 30-ту добу для хіміко-аналітичного аналізу, використовуючи препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин, на який отримано патент на корисну модель [104].

До третьої (III) групи (група з хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП) входило 120 щурів, яким моделювали хронічну гіперглікемію та дірчастий дефект лівої великогомілкової кістки аналогічно попереднім групам, але з метою можливої корекції негативного впливу ХГ на процеси репаративного остеогенезу перед накладанням шкірного шва у дефект було введено збагачену тромбоцитами плазму крові (доза – 0,25 мл). Із цією метою попередньо у тварин із латеральної хвостової вени проводили забір 1 мл крові у вакутайнери із розчином натрію цитрату. Втрачений об'єм крові негайно відновлювали інфузією стерильного фізіологічного розчину. Відібрану кров центрифугували протягом 20 хв зі швидкістю 2000 об/хв. У результаті у пробірці спостерігались дві фракції компонентів крові: нижня фракція темно-червоного кольору (клітинні компоненти) та верхня фракція солом'яно-жовтого кольору (компоненти сироватки). Після цього піпетували увесь вміст верхньої фракції та верхньої частини нижньої фракції і переносили їх в іншу пробірку. Отриманий матеріал центрифугували протягом 15 хв зі швидкістю 2000 об/хв при температурі 21-23°C, що призводило до утворення двох фракцій: нижньої – збагаченої тромбоцитами плазми, верхньої – бідної тромбоцитами плазми. Вміст нижньої фракції переносили у стерильну пробірку та доводили об'єм до 1 мл за допомогою 10 % розчину кальцію хлориду. Отриманий розчин вводили тваринам у рану. З експерименту тварин виводили шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг / 100 г маси тіла): на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми по 20 щурів для гістологічного та ультрамікроскопічного дослідження; по 10 щурів із групи на 3-тю та 30-ту добу для хіміко-аналітичного аналізу.

У нашій роботі ми використали стрептозотоцин індуковану модель хронічної гіперглікемії з попередній введенням нікотинової кислоти.

Механізм дії стрептозотоцина пов'язаний з наявністю в його хімічній структурі сахарозного залишку (гексози), за рахунок якого, через транспортну систему GLUT-2, він вибірково включається β -клітинами острівців Лангерганса в обмінні процеси замість глюкози. Ураження β -клітин стрептозотоцином обумовлено алкілуванням ДНК з наступною активацією полі-АДФ-рибозосинтетази, виснаженням клітинного пулу NAD^+ , що призводить у кінцевому підсумку до загибелі клітин [205]. Руйнування β -клітин викликає зниження синтезу та секреції у кров інсуліну, в результаті чого у тварин розвивається гіперглікемія [206].

Нікотинова кислота та нікотинамід знижує цитотоксичну дію СТЗ. Вони захищають β -клітини за допомогою зв'язування безкисневих радикалів та NO, проявляючи антиоксидантну здатність, забезпечують клітину NAD^+ , пригнічують апоптоз β -клітин. Крім того, вони діють як акцептори метильних груп, що знижує метилювання ДНК. Попереднє введення нікотинової кислоти або нікотинамиду призводить до зниження діабетогенної дії стрептозотоцину [207].

Крім того, залежно від введеної дози стрептозотоцину (в нашому експерименті 40 мг/кг) та шляху введення (внутрішньоочеревинно), можливо моделювати різної тяжкості порушення вуглеводного обміну, які відповідають певним клінічним типам цукрового діабету ((ЦД 1 або 2 типу) [208].

Тому, ми вибрали внутрішньоочеревинне введення стрептозотицину дозою 40 мг/кг із попереднім введенням нікотинової кислоти, що дозволило нам змодельовати хронічну гіперглікемію у щурів, подібну такої, яка розвивається при ЦД 2 типу та, яка не потребує корекції інсуліном.

Також, нами було проведено підтвердження ефективності вибраної моделі хронічної гіперглікемії шляхом визначення низки показників біохімічного аналізу крові щурів. Для проведення даного аналізу потрібно здійснити забір не менше, ніж 3-ох мл крові від тварини, що становить

приблизно 25-30 % від загального об'єму крові, що може призводити до шокового стану та патологічних наслідків у тварин, сприяти неправильному трактуванню отриманих результатів [19]. Тому, забір крові для біохімічного аналізу від щурів основних досліджуваних груп (I, II, III) було неможливим.

Тому для оцінки стану глюкозного гомеостазу та підтвердження наявності гіперглікемії, нами була введена IV група (група контролю гіперглікемії) до якої входило 20 щурів (10 щурів із ХГ та 10 інтактних тварин, для коректного порівняння отриманих даних). 10 тваринам цієї групи було проведено моделювання ХГ за вище описаною методикою та на 60 добу після відтворення моделі у тварин визначали показники вмісту глюкози натще, інсуліну, глікозильованого гемоглобіну та С-пептиду в плазмі крові тварин. Інтактним тваринам була зроблена одноразова внутрішньочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буферу та через 60 діб визначені дані показники (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Результати біохімічного аналізу крові щурів інтактної групи
та групи контролю гіперглікемії

Показник	Контрольна група (n = 10)	Група контролю гіперглікемії (n = 10)	Р
Глюкоза натще, ммоль/л	4,89 ± 1,02	13,65 ± 2,21	< 0,001
Інсулін, мкМО/мл	14,86 ± 2,51	12,67 ± 1,05	0,020
С-пептид, нг/мл	3,51 ± 0,56	3,37 ± 0,45	0,579
НbA1c (%)	5,50 ± 1,01	7,36 ± 0,52	< 0.001

Примітка. Результати представлені у вигляді M ± SD

2.2 Методи дослідження

У даній роботі нами були використані наступні методи:

2.2.1 Гістологічне, ультрамікроскопічне вивчення та морфометрія

Фрагменти великогомілкових кісток з дефектом фіксували у 10 % розчині формаліну, демінералізацію проводили у 5 % водному розчині Трилону Б (етилендіамінтетраоцтова кислота). Далі зразки зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та проводили заливку в парафін. Потім з отриманих препаратів робили зрізи на санному мікротомі МС-2 з товщиною 4-6 мкм. Далі гістологічні зрізи фіксували на знежирені предметні скельця та висушували. Фарбування проводили гематоксилін-еозином. Світлову мікроскопію проводили з використанням мікроскопу Olympus BH-2 (Японія) (біокуляр $\times 10$, $\times 15$, об'єктиви $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Фотографування гістологічних препаратів виконували цифровою камерою Baumer/optronic Тур: CX 05c. Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою мікросітки, мікролінійки та з використанням обчислювальної програми «Digimizer». Вимірювали наступні параметри: площа запального інфільтрату (мм^2), площа грануляційної тканини (мм^2), площа фіброретикулярної тканини (мм^2), площа ретикулофіброзної кісткової тканини (мм^2), площа хрящової тканини (мм^2). Також, дані показники були перераховані у відсотковому співвідношенні від загальної площі регенерату для кожного щура з використанням програми Microsoft Excel 2016 та SPSS-17.

Для ультрамікроскопічного вивчення дефекту великогомілкових кісток вилученні шматочки регенерату фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіду на 0,2 М какодилатному буфері з рН = 7,2 за температури $+4^\circ\text{C}$. Після цього препарати промивали у цьому самому буфері та постфіксували в 1 % розчині OsO_4 . Далі шматочки біоптатів зневоднювали за допомогою серії спиртів висхідної концентрації (по 20 хвилин у 50, 70, 80, 90 та 100 % розчинах).

Заливали матеріал у капсули з готовою сумішшю смол епону та аралдиту (аралдит М – 20 мл, епон 812 – 25 мл, ущільнювач ДДСА – 60 мл, каталізатор ДМР-30 – 2 % (6 крапель) та залишали на 1 добу за кімнатної температури повітря. Після цього препарати поміщали у термошафу за температури 60 °С для полімеризації. Використовуючи ультрамікроскоп УМТП-6м (Україна) готували напівтонкі (1 мкм) та ультратонкі (40–60 нм) зрізи. Фарбування напівтонких зрізів проводили метиленовим синім та у світловому мікроскопі вивчали препарати, а після цього прицільно заточували пірамідки перед ультрамікроскопуванням. Ультратонкі зрізи встановлювали на мідні сітки та дворазово контрастували, спочатку впродовж 15 хвилин у 2 % розчині уранілацетату, а вже потім упродовж 30 хвилин у розчині цитрату свинцю за Рейнольдсом. Ультрамікроскопічне дослідження реалізовували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM-1230 (фірма JEOL, Японія) та досліджували ультраструктуру регенерата.

2.2.2 Ультрамікроскопічне вивчення

Для ультрамікроскопічного вивчення поверхні дефекту з використанням растрової електронної мікроскопії травмовані великогомілкові кістки щурів видаляли та фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіду на 0,2 М какодилатному буфері з рН = 7,2 за температури +4 °С і постфіксували в 1 % розчині OsO₄ впродовж 4 годин за температури +4 °С, дегідрували за допомогою серії етилового спирту висхідної концентрації. Фіксували на графітових столиках та висушували на повітрі. Перед розглядом у растровому мікроскопі зразки напилювали золотом у вакуумному універсальному пості «ВУП-5», поміщали в растровий електронний мікроскоп «РЕМ 102» та досліджували морфологію клітин та тканиноспецифічних структур поверхні регенерату.

2.2.3 Хіміко-аналітичний аналіз

Визначення вмісту макро- та мікроелементів у ділянках дефекту з прилеглою кісткою проводили методами атомно-абсорбційної спектроскопії з електротермічною та полуменевою атомізацією. Зразки кісток обсушували фільтрувальним папером для видалення надлишку рідин. Зважування зразків проводили у фторопластових стаканах на електронних аналітичних вагах ANG100C фірми «AXIS» II класу. Після зважування стакани зі зразками переносили у фторопластовий автоклав і вносили 3 мл нітратної кислоти для кислотної мінералізації. Вміст елементів у реактивах та на стінках посуду контролювали приготуванням «холостої проби».

Автоклави нагрівали на лабораторній електричній плитці Saturn ST-EC1161 із термостатом за температури 150-160 °C упродовж 2 годин, охолоджували, вміст стаканів переносили в мірні пробірки і доводили бідистилятом до 10 мл. Після автоклавної мінералізації отримували безбарвні прозорі рідини, придатні для визначення вмісту хімічних елементів атомно-абсорбційними методами.

Вміст К (мг/г), Na (мг/г) та Ca (мг/г) визначали на спектрофотометрі S-115-M1 AT «Selmi» (Україна) з полуменевою атомізацією в режимі емісії (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Спектральні умови вимірювання та атомізації для К, Na та Ca

Елемент	Довжина хвилі, нм	Спектральна щілина, нм	Горючий газ	Окисник	Температура полум'я	Тип полум'я
К	769,9	0,4	C ₂ H ₂	Повітря	2300	Окисне
Na	589,0	0,4	C ₂ H ₂	Повітря	2300	Окисне
Ca	422,7	0,4	C ₂ H ₂	N ₂ O	2950	Стехіометричне

Визначення концентрації Mg (мг/г), Fe (мкг/г), Zn (мкг/г) та Cu (мкг/г) проводили на комплексі атомно-абсорбційному CAS-120.1 з електротермічним атомізатором А-5 і графітовою піччю Carl Zeiss Jena (Німеччина) в режимі адсорбції (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Спектральні та температурно-часові режими вимірювань

Елемент	Довжина хвилі, нм	Ширина щілини, нм	Піроліз		Атомізація	
			T, °C	τ, с	T, °C	τ, с
Mg	202,6	0,4	1 000	10	2 200	5
Fe	372,0	0,4	1 000	10	2 500	5
Zn	213,9; 307,4	1,0	600	10	2 100	5
Cu	324,7	0,4	1 000	10	2 500	5

Проби відміряли і вносили в піч дозатором FAA-50 об'ємом 10 мкл. Аналітичний сигнал сканували з кроком 0,016 с та обробляли програмою «AAS-SPECTR3».

2.2.4 Статистичний аналіз

Статистичну та математичну обробку усіх отриманих числових даних проводили із використанням електронного пакету програм SPSS-17 та Microsoft Excel 2016. Отримані дані у роботі представлені у вигляді середньої арифметичної (M) та середнього квадратичного відхилення (SD). Перевірку величин на нормальність розподілу проводили із застосуванням критерію Колмогорова-Смірнова. Однорідність дисперсій перевіряли за допомогою критерію Лівіня. Визначення достовірності відмінностей між двома групами проводили із використанням параметричного критерію Стьюдента (t), між трьома – однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA) із подальшим апостеріорним тестом Бонферроні. Відмінність вважали достовірною, якщо вірогідність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза довгих кісток скелета контрольної групи тварин

Ділянка дефекту на 3-тю добу дослідження у контрольній групі тварин була заповнена запальним інфільтратом: фібрином, еритроцитами, нейтрофільними гранулоцитами, макрофагами, кістковим детритом та фібробластими. Спостерігались значні острівці крововиливів. Але, вже на цьому терміні експерименту відбувалось формування артеріол (рис. 3.1.1 та рис. 3.1.2).

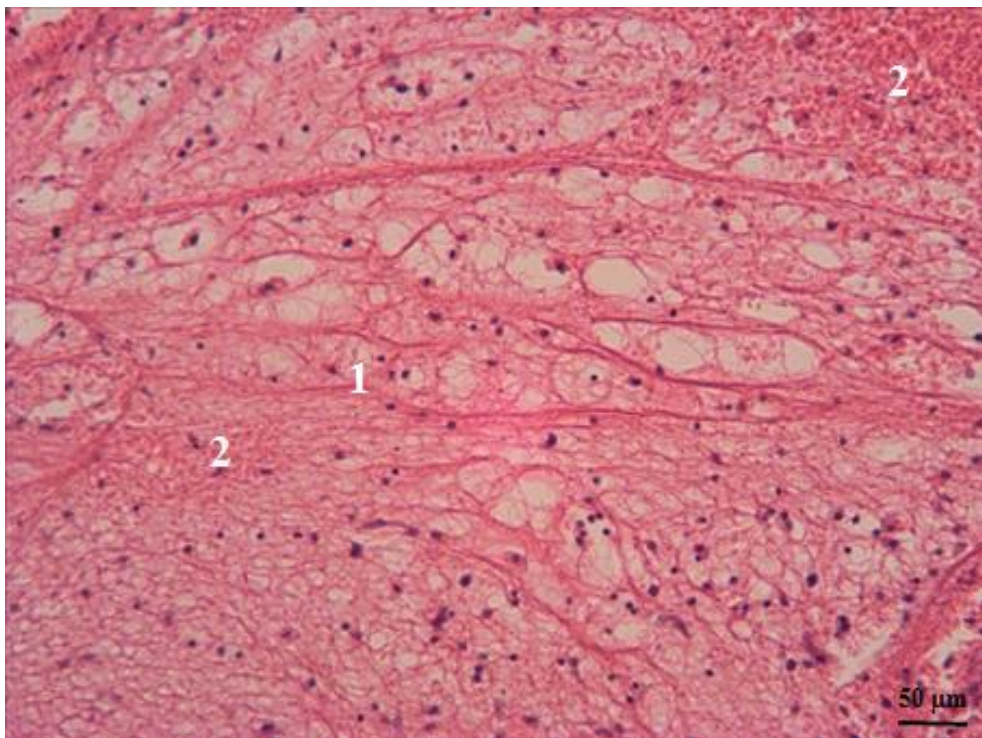


Рисунок 3.1.1 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 3-тю добу репаративного остеогенезу. Фібрин (1), еритроцити (2), фібробласти (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

Площа запального інфільтрату склала $(71,31 \pm 1,55)$ % від усїєї зони остеорепації, а грануляційної тканини $(28,69 \pm 1,54)$ % (рис. 3.1.3).

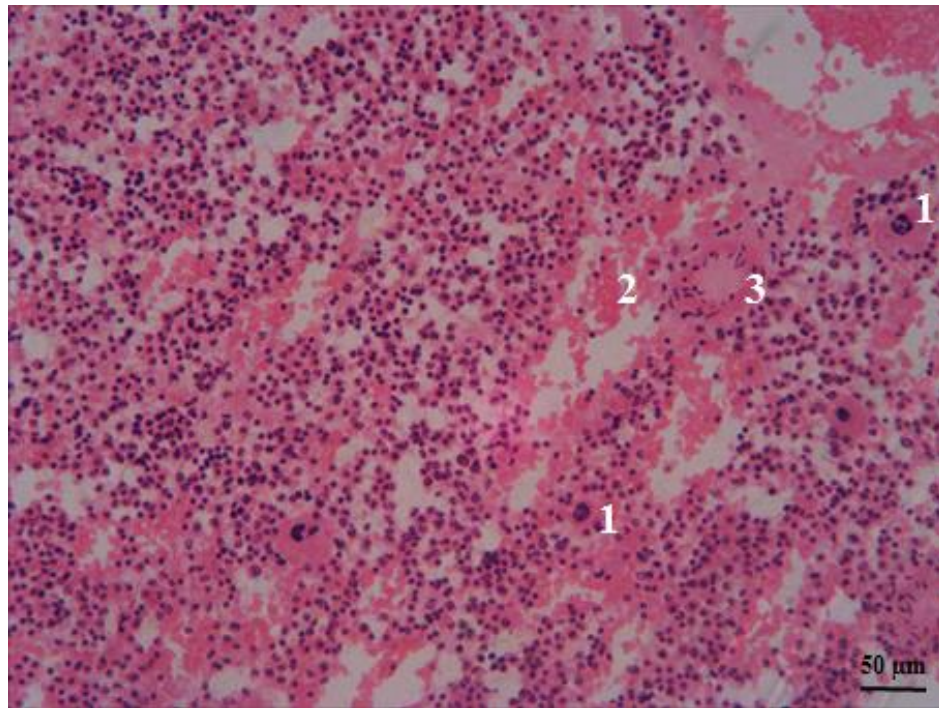


Рисунок 3.1.2 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 3-тю добу репаративного остеогенезу. Нейтрофільний гранулоцит (1), еритроцити (2), артеріола (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. 3б. х 200



Рисунок 3.1.3 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки контрольної групи щурів на 3-тю добу дослідження

На електронних сканограмах ділянки дефекту на 3-тю добу експерименту ми спостерігали скупчення еритроцитів та кістково-клітинного детриту (рис. 3.1.4).

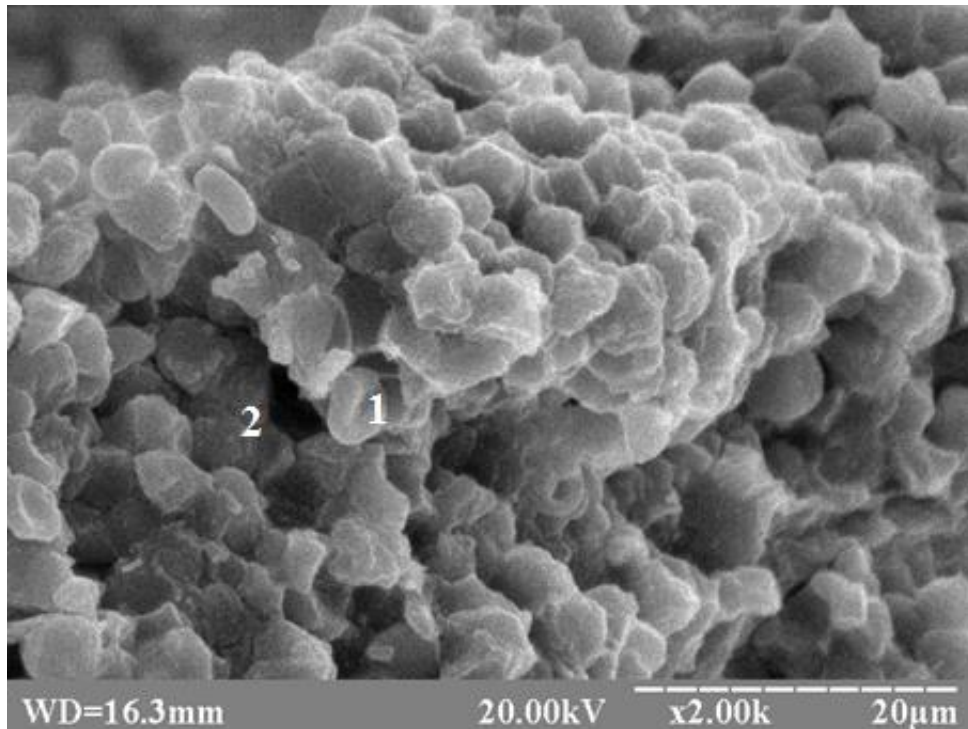


Рисунок 3.1.4 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 3-тю добу репаративного остеогенеза. Еритроцити (1), кістково-клітинний детрит (2). Електронна сканограма

Результати вивчення вмісту хімічних елементів у регенераті на 3-тю добу остеогенезу показали, що вміст натрію становив $(1,81 \pm 0,05)$ мг/г, калію – $(1,92 \pm 0,12)$ мг/г, кальцію – $(2,12 \pm 0,29)$ мг/г, заліза – $(39,31 \pm 1,35)$ мкг/г, магнію – $(2,63 \pm 0,59)$ мг/г, цинку – $(81,34 \pm 2,69)$ мкг/г, міді – $(0,28 \pm 0,08)$ мкг/г (рис. 3.1.5).

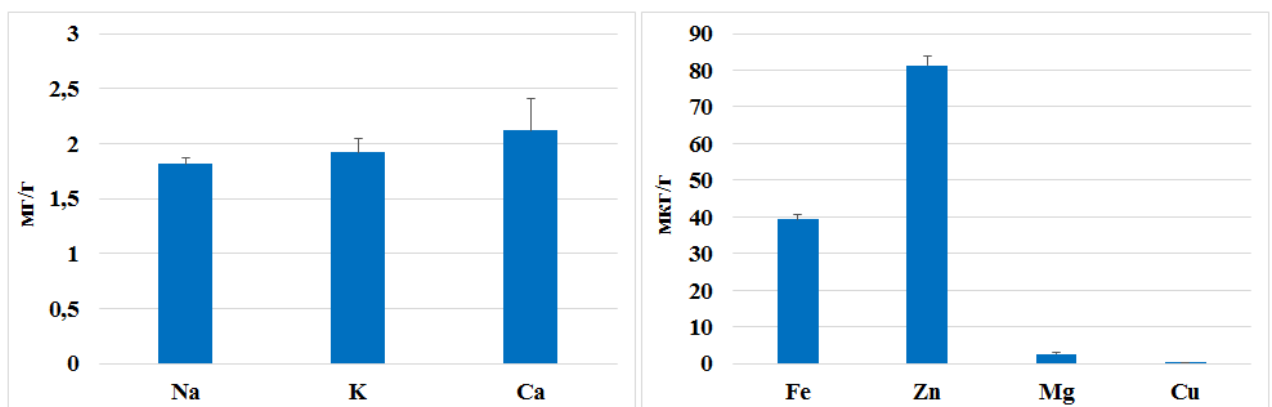


Рисунок 3.1.5 – Показники вмісту макро- та мікроелементів регенерата великогомілкової кістки у щурів контрольної групи на 3-тю добу дослідження

На 7-му добу дослідження більша половина площі регенерату була очищеною від запального інфільтрату. У ділянках біля материнської кістки формувалась фіброретикулярна тканина – спостерігались багаточисленні фібробласти в оточенні сполучнотканинного матриксу. Центральна зона регенерату залишалась заповненою запальним інфільтратом – фібрином та лейкоцитами (рис. 3.1.6 – 3.1.7), загальна площа якого становила $(2,16 \pm 0,14) \%$ від усього регенерата.

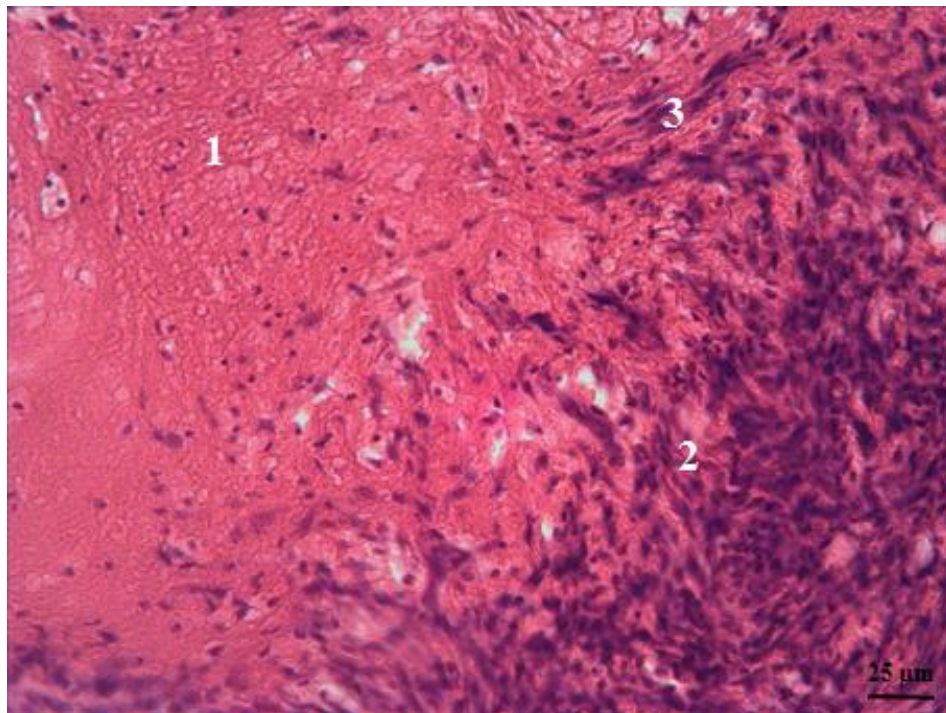


Рисунок 3.1.6 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 7-му добу репаративного остеогенезу. Фібрин (1), пучки колагенових волокон (2), фібробласти (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400

Площа грануляційної тканини у регенераті на 7-му добу дослідження у щурів контрольної групи склала $(51,45 \pm 2,82) \%$, а фіброретикулярної – $(46,39 \pm 2,82) \%$ (рис. 3.1.8).

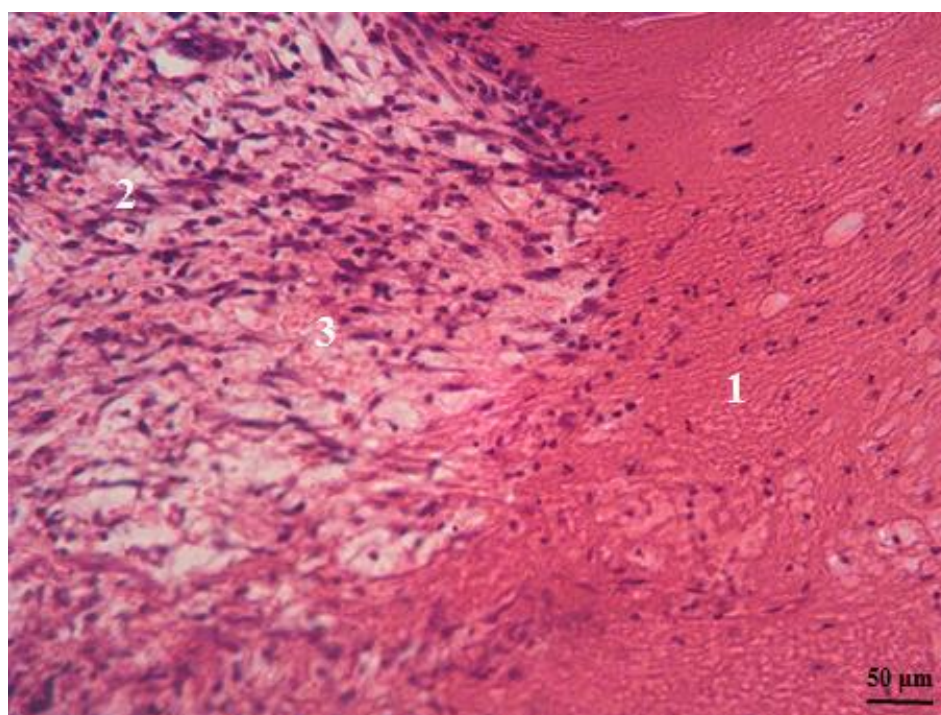


Рисунок 3.1.7 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 7-му добу репаративного остеогенезу. Нитки фібрину (1), молоді колагенові волокна (2), еритроцити (3). Зabarвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

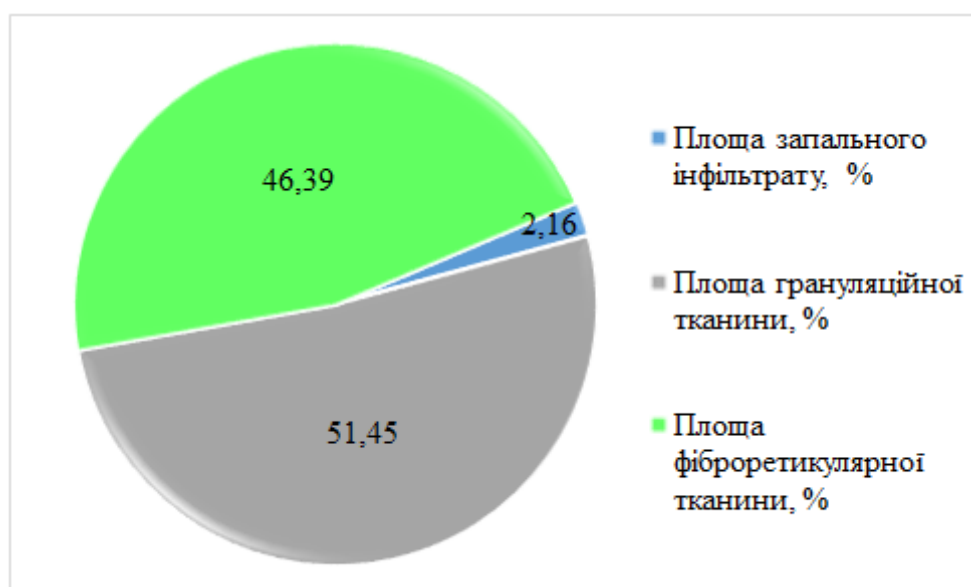


Рисунок 3.1.8 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки контрольної групи щурів на 7-му добу дослідження

На 14-ту добу дослідження репаративний остеогенез характеризувався формуванням остеогенних балок. З'являлися чітко відмежовані молоді лакуни з остеобластами. Добре простежувалися повнокровні капіляри (рис. 3.1.9 – 3.1.10).

На 14-ту добу репаративного остеогенеза при ультрамікроскопічному дослідженні регенерату ми виявили фібробласти з великими за розмірами ядрами, які містили гетерохроматин, розширені пори каріолеми. Цитоплазма мала дилатовані цистерни ендоплазматичного ретикулума із вираженими рибосомами на їх поверхні, що свідчить про високу синтетичну активність клітин. Мітохондрії були різних розмірів, одні мали просвітлений матрикс та великі розміри, а частина була невеликими за розмірами та мала електроннощільний матрикс. Крім того, цитоплазма клітин містила темні вклучення та гранули (3.1.11).

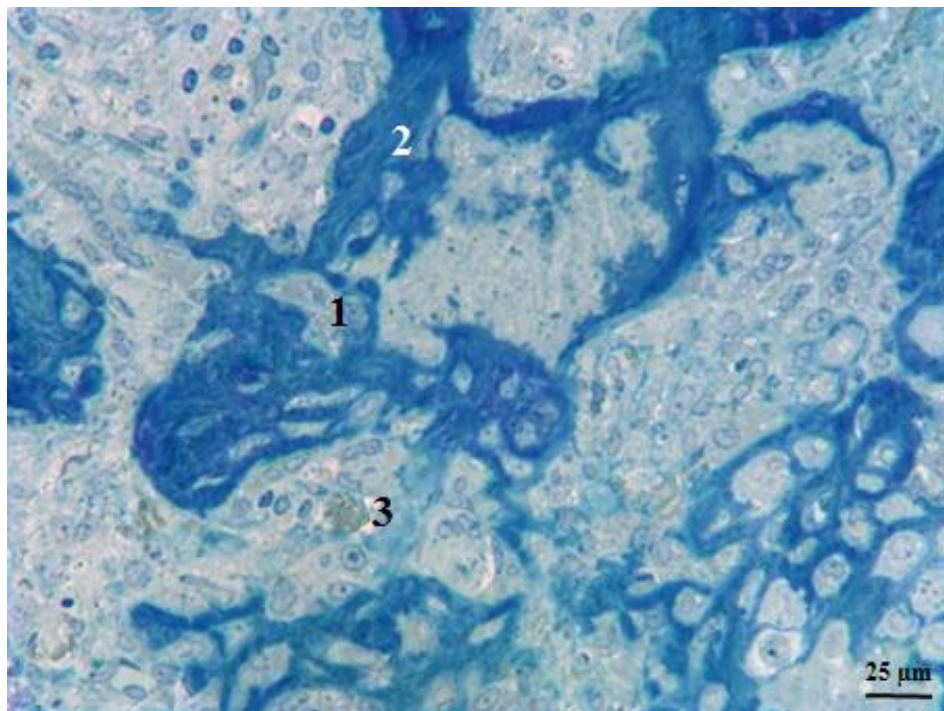


Рисунок 3.1.9 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Лакуни з остеобластами (1), остеогенні балки (2), капіляри (3). Напівтонкий зріз. Забарвлення метиленовим синім. Зб. х 400

Посттравматична ділянка складалася із фіброретикулярної тканини на $(55,44 \pm 1,82)$ % від усієї площі регенерату та ретикулофіброзної кісткової тканини на $(44,56 \pm 1,82)$ % (рис. 3.1.12). Запальної клітинної інфільтрації та грануляційної тканини на 14-ту добу репаративного остеогенезу ми не виявили.

На електронних сканограмах дефекту на 14-ту добу дослідження простежувалася велика кількість остеобластів на поверхні остеогенних балок. Клітини мали кулясту та кубічну форми, довгі й тонкі відростки. Також, добре було видно початок замурування остеобластів у власний матрикс (рис. 3.1.13).

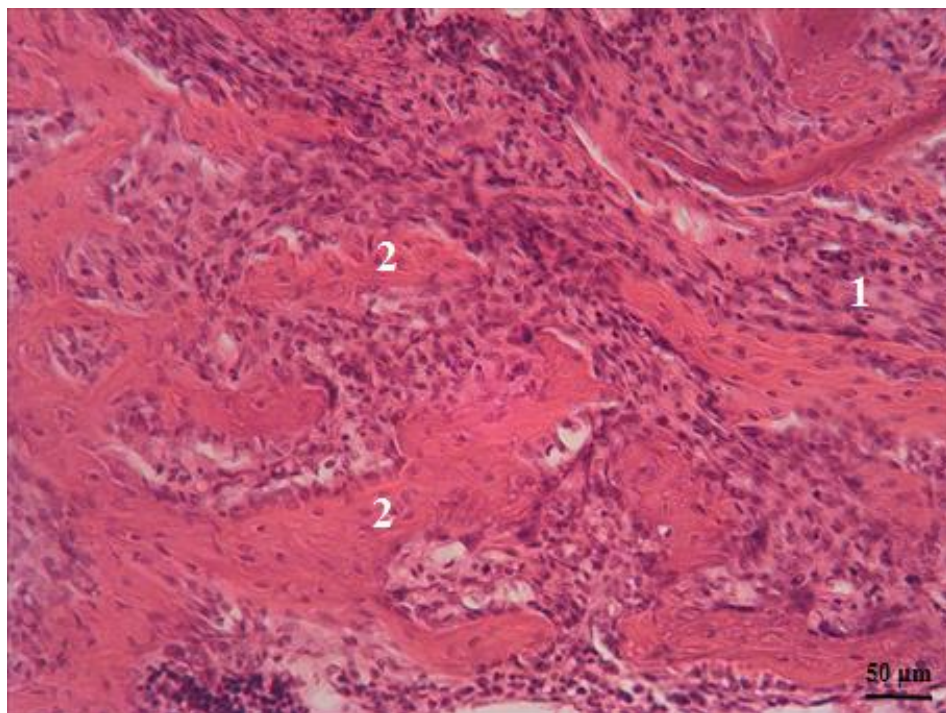


Рисунок 3.1.10 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Сполучна тканина (1), остеогенні трабекули (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

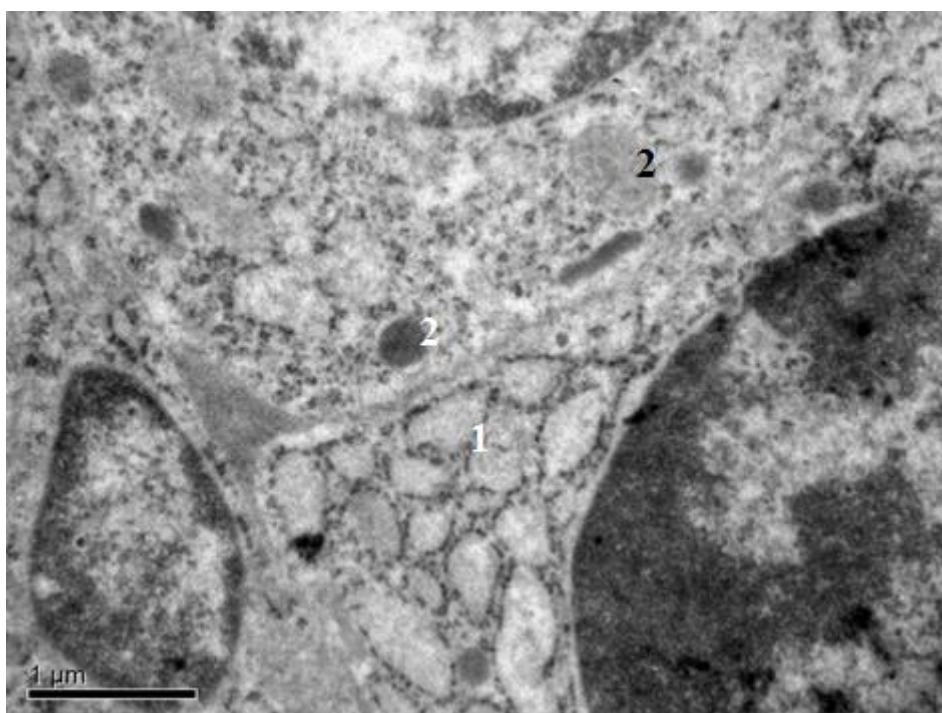


Рисунок 3.1.11 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура контрольної групи на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Цистерни ендоплазматичного ретикулума (1), мітохондрії (2). Контрастування ураніацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

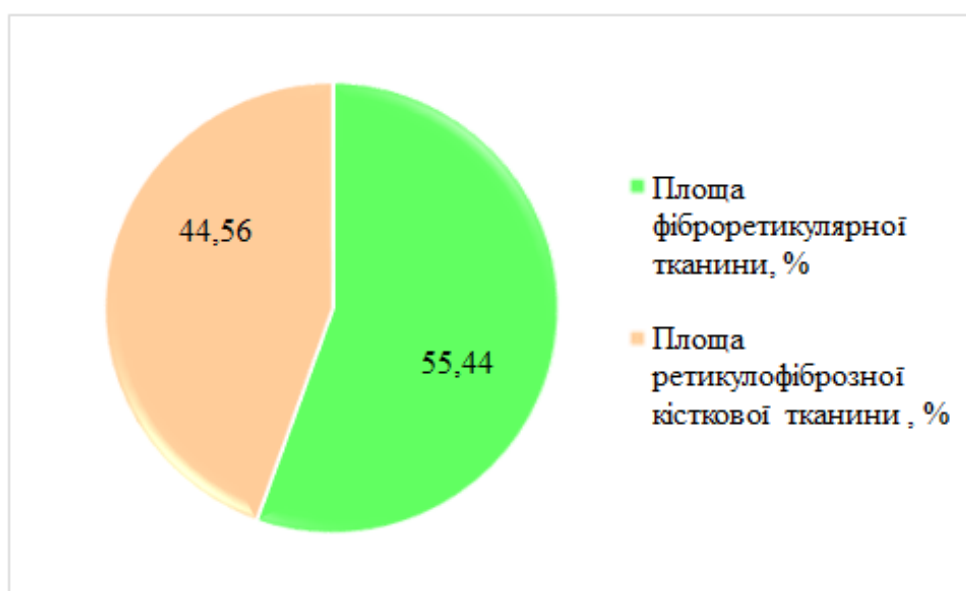


Рисунок 3.1.12 – Площі тканиноспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки контрольної групи щурів на 14-ту добу дослідження

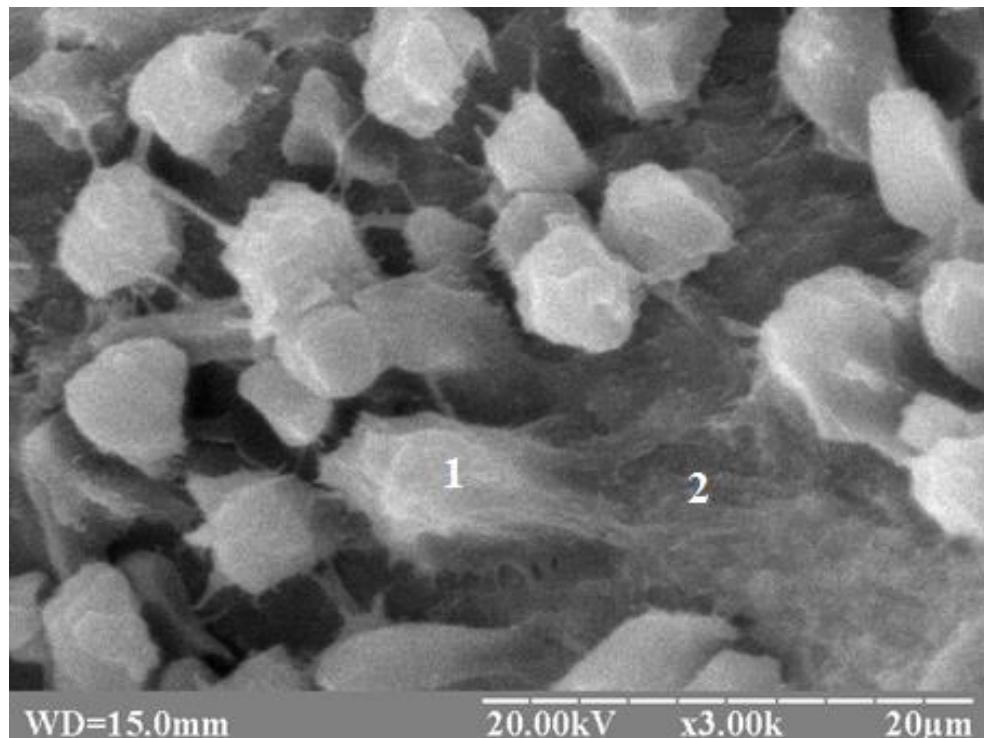


Рисунок 3.1.13 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Остеобласт (1), кістковий матрикс (2). Електронна сканограма

На 21-шу добу формування кісткових балок продовжувалось. Найвиразнішим цей процес відбувався біля материнської кістки, де утворення кісткових трабекул проходило у вигляді тяжів у товщу сполучнотканинного матриксу. Навколо капілярів простежувався початок формування первинних остеонів. У центральній частині дефекту залишалась незначна площа фіброретикулярної сполучної тканини, у якій тільки спостерігався початок упорядкування колагенових волокон та трансформація їх в остеїдні балки (рис. 3.1.14).

На електронних сканограмах на 21-шу добу дослідження, новоутворенні кісткові трабекули мали комірчасту будову, циркулярне розміщення, формували розгалужену мережу широких кісткових тяжів, простори між якими були заповненні круглими клітинами кісткового мозку та волокнами. Крім того, на поверхні балок спостерігалися вбудовані остеобласти у власний матрикс (рис. 3.1.15).

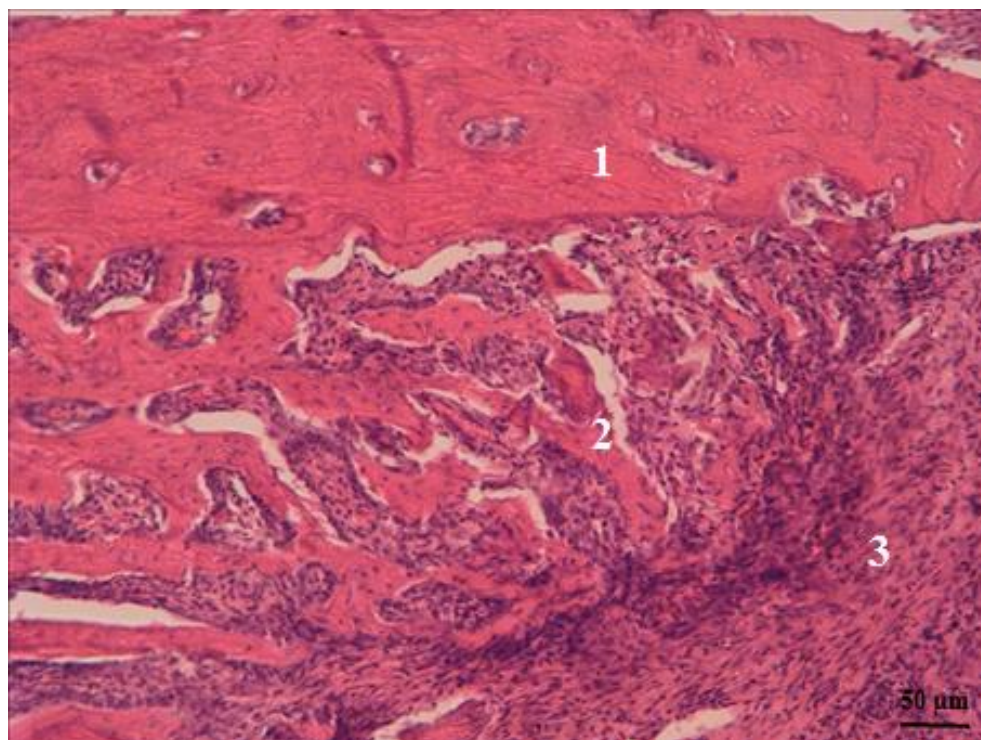


Рисунок 3.1.14 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Материнська кістка (1), кісткові трабекули (2), фіброретикулярна тканина (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

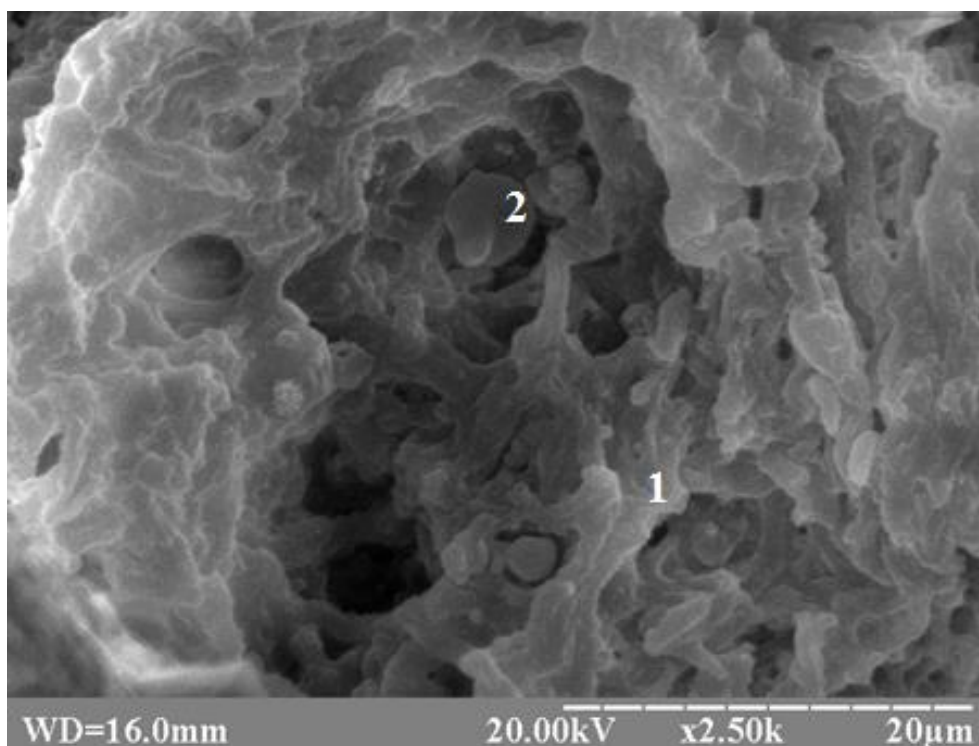


Рисунок 3.1.15 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Кісткові трабекули (1), клітини кісткового мозку (2). Електронна сканограма

На 21-шу добу експерименту у регенераті при ультрамікроскопічному дослідженні з використанням трансмісійного електронного мікроскопа було виявлено остеобласти в оточенні власного матрикса. Клітини мали центрально розміщені ядра з грудками гетерохроматину та роширеними порами каріолеми. Спостерігались місця розриву гетерохроматину. Цитоплазма містила різних за розмірами та ступеня дилатації цистерни ендоплазматичного ретикулума, велику кількість лізосом, включень та вакуоль. Мітохондрії біля ядра були гіпертрофованими, мали видовжену форму. Під плазмолемою мітохондрії мали круглу форму та різні розміри, паралельно організовані кристи. Безпосередньо навколо клітин спостерігались пучки тонких колагенових волокон. Матрикс місцями був розрихлений, локально містив електроннощільні гранули (рис. 3.1.16).

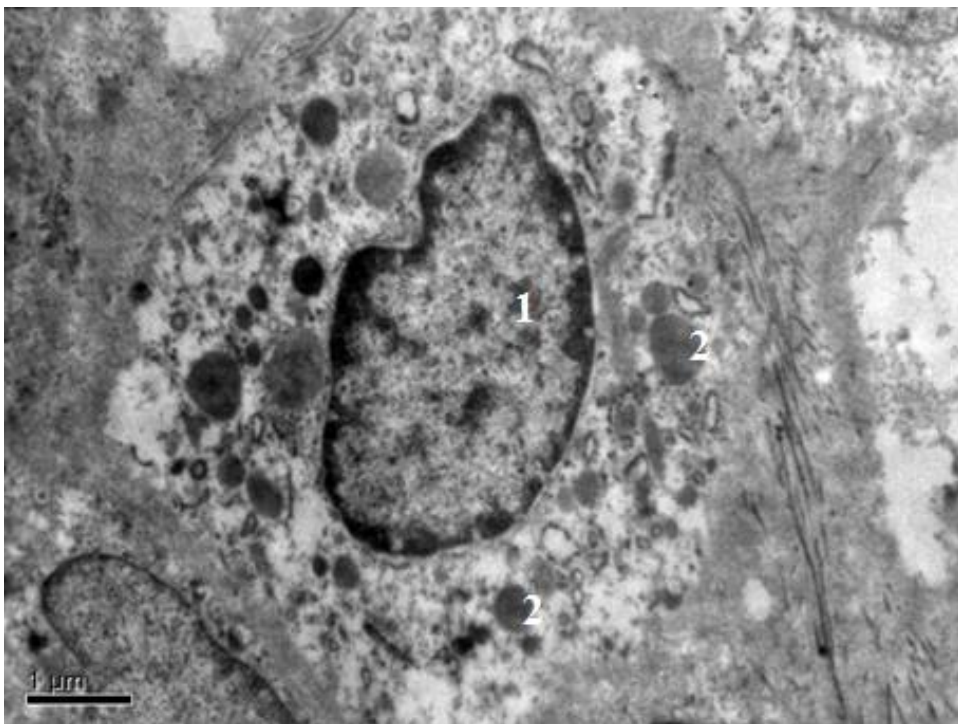


Рисунок 3.1.16 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура контрольної групи на 21-шу добу репаративного остеогенеза. Ядро остеобласта (1), мітохондрії (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

Площа фіброретикулярної тканини складала $(42,32 \pm 1,77)$ % від усієї площі регенерату, а ретикулофіброзної кісткової тканини – $(57,68 \pm 1,77)$ % на 21-шу добу експерименту (рис. 3.1.17).

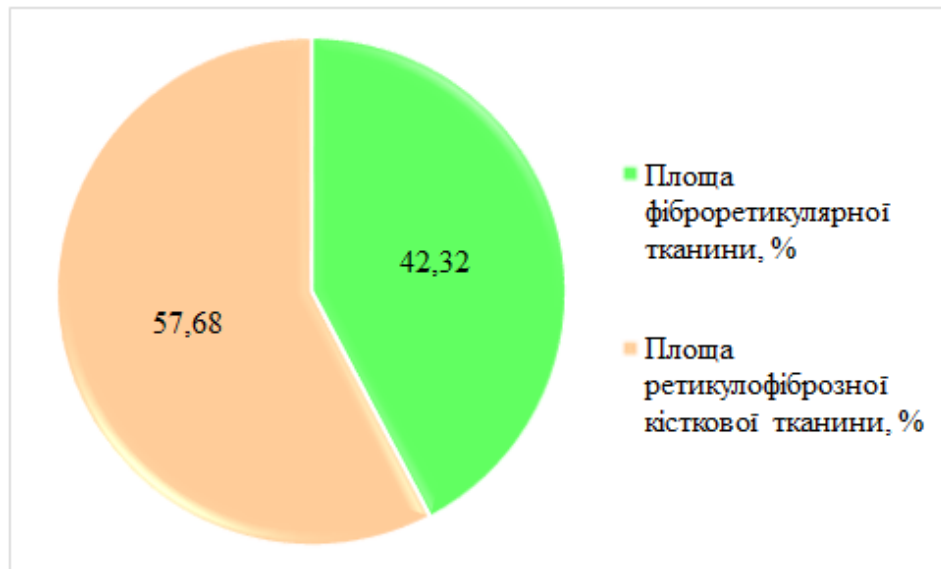


Рисунок 3.1.17 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки контрольної групи щурів на 21-шу добу дослідження

На 30-ту добу експерименту у тварин контрольної групи кістковий дефект був майже повністю заповнений сформованою новоутвореною кістковою тканиною. Водночас уже на цій стадії репаративного остеогенезу почалися процеси ремоделювання новоутвореної ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту. Навколо кісткових балок спостерігались активні остеокласти, цитоплазма яких містила велику кількість везикул та вакуоль. Нова пластинчаста кісткова тканина містила повноцінні остеони зі сформованими Гаверсовими каналами. Найінтенсивніше ці процеси відбувалися біля материнської кістки. Центральна ділянка дефекту залишалася заповненою щільно упакованою ретикулофіброзною кістковою тканиною (рис. 3.1.18-3.1.20).

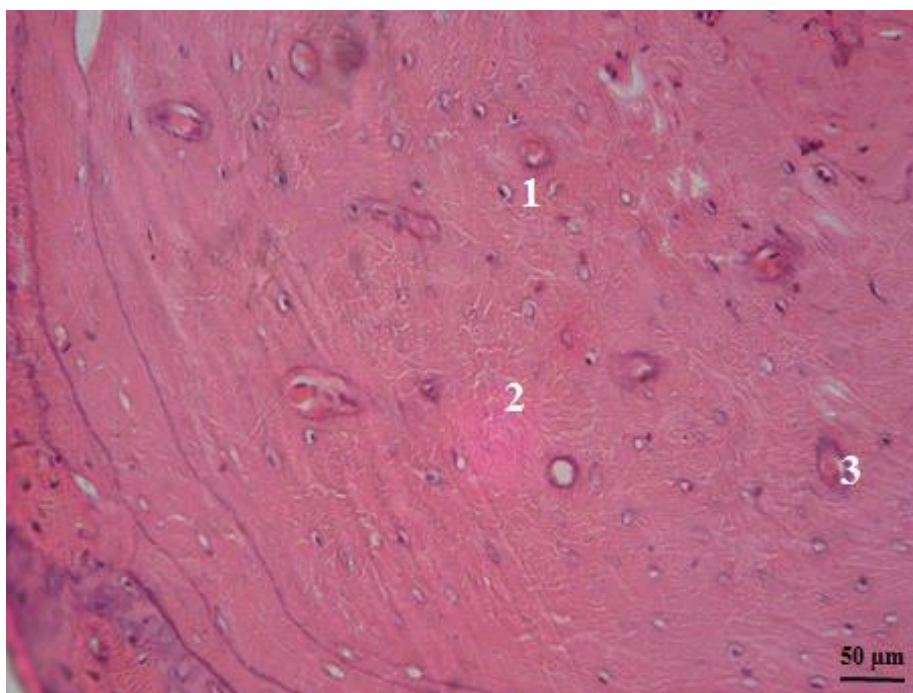


Рисунок 3.1.18 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу репаративного остеогенезу. Остеони (1), пластинчаста кісткова тканина (2), капіляри (3). Зabarвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

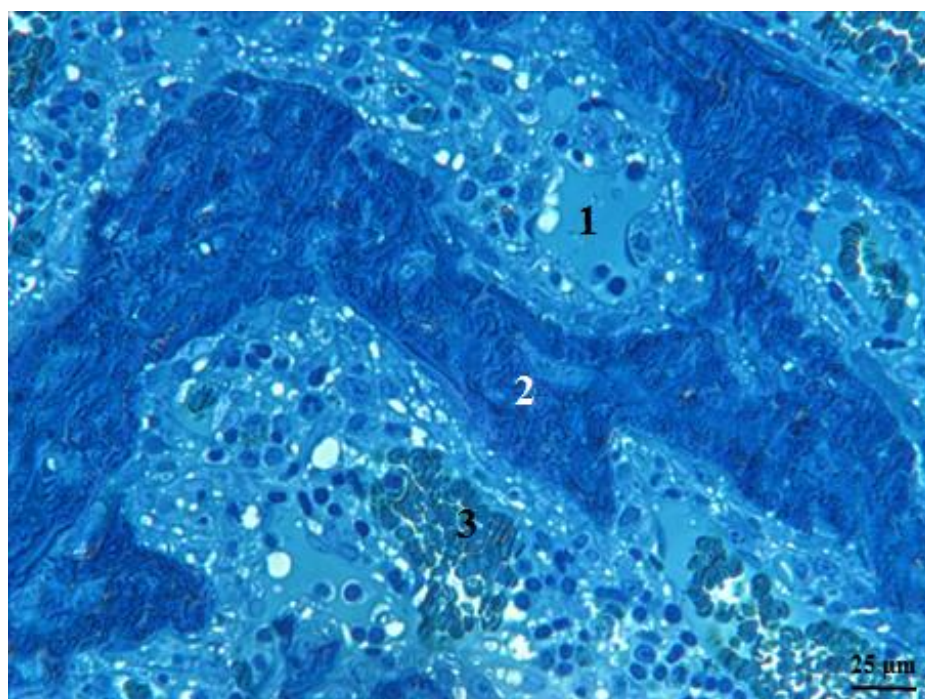


Рисунок 3.1.19 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу репаративного остеогенезу. Остеокласти (1), кісткові трабекули (2), капіляри (3). Зabarвлення метиленовим синім. Зб. х 400

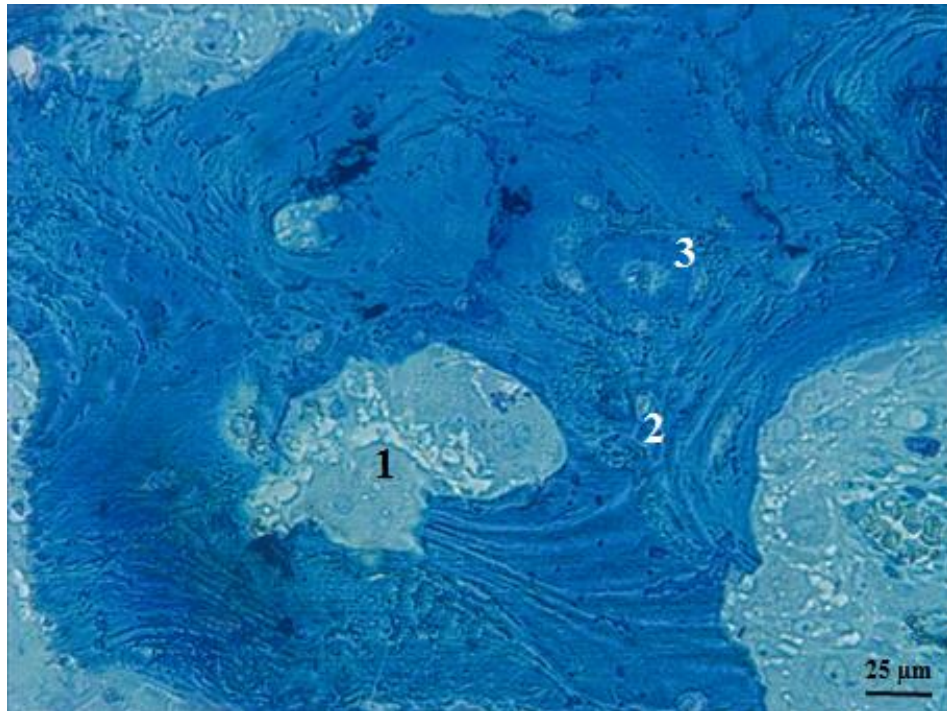


Рисунок 3.1.20 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу репаративного остеогенезу. Остеокласти (1), кісткові трабекули (2), остеон (3). Забарвлення метиленовим синім. Зб. х 400

Дефект кістки на 30-ту добу експерименту у контрольній групі був заповнений новоутвореною ретикулофіброзною та пластинчастою кістковою тканиною, площа яких становила $(84,44 \pm 1,03)$ % від усієї зони остеорепарації. Інша частина дефекту була заповнена фіброретикулярною тканиною на $(15,56 \pm 1,03)$ % від усієї площі регенерату (рис. 3.1.21).

Хіміко-аналітичний аналіз регенерату на 30-ту добу остеогенезу показав, що вміст натрію становив $(1,43 \pm 0,14)$ мг/г, калію – $(1,29 \pm 0,28)$ мг/г, кальцію – $(4,28 \pm 0,29)$ мг/г, заліза – $(27,98 \pm 1,18)$ мкг/г, магнію – $(2,11 \pm 0,59)$ мг/г, цинку – $(61,03 \pm 3,71)$ мкг/г, міді – $(0,21 \pm 0,06)$ мкг/г (3.2.22).

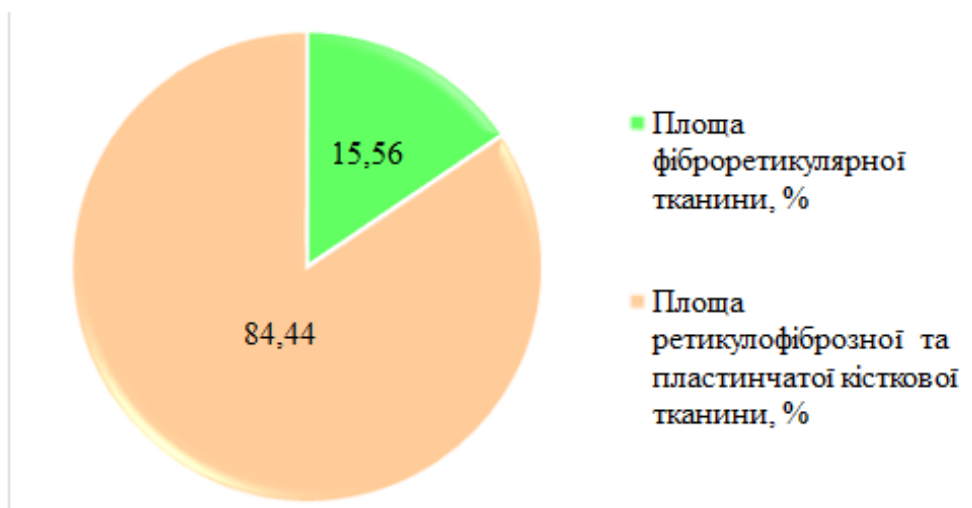


Рисунок 3.1.21 – Площі тканиноспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки контрольної групи щурів на 30-ту добу дослідження

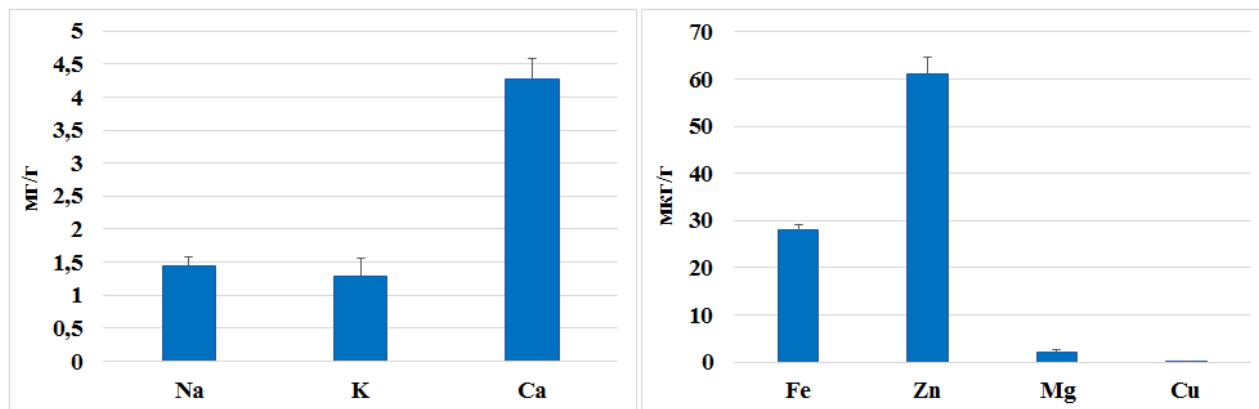


Рисунок 3.1.22 – Показники вмісту макро- та мікроелементів регенерата великогомілкової кістки у щурів контрольної гурпи на 30-ту добу дослідження

При скануванні місця дефекту великогомілкової кістки контрольної групи на 30-ту добу дослідження його поверхня була покрита новоутвореною кісткою пронизаною численними транскортикальними судинними отворами та остеобластними лакунами (рис. 3.1.23).

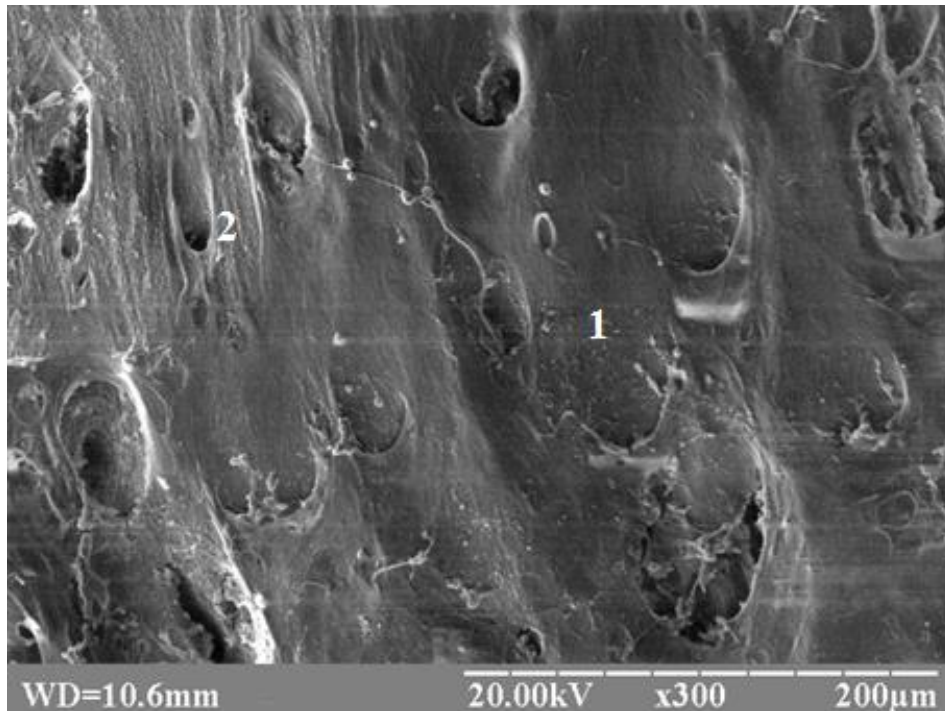


Рисунок 3.1.23 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу репаративного остеогенезу. Поверхня новоутворенної кістки (1), транскортикальні отвори (2). Електронна сканограма

Отже, отримані результати показали, що у тварин без ХГ остеогенез на 30-ту добу завершується утворенням ретикулофіброзної та пластинчастої кісткової тканини на $(84,44 \pm 1,03) \%$ від усієї зони остеорепарації. При цьому, відбувалося інтенсивне remodelювання ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту. Спостерігались активні остеокласти із великою кількістю везикул та вакуоль. Поверхня нової кістки мала численні транскортикальні судинні отвори та остеобластні лакуни.

Отримані дані будуть використані для коректного порівняльного аналізу при вивченні остеогенезу у тварин із хронічною гіперглікемією та при застосуванні ЗТП.

Основні результати розділу опубліковані у працях [102, 105-109].

3.2 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза довгих кісток скелета щурів за умов хронічної гіперглікемії

Ділянка дефекту на 3-тю добу дослідження у групі тварин із хронічною гіперглікемією була заповнена запальним інфільтратом, що складався із фібрину, поодиноких фіброblastів, великих скупчень еритроцитів, нейтрофільних гранулоцитів, поодиноких лімфоцитів, дрібного кісткового детриту. Але на відміну від контрольної групи у запальному інфільтраті переважали нейтрофільні гранулоцити, а також спостерігалися некротичні залишки кісткового мозку (рис. 3.2.1 та рис. 3.2.2). При цьому, площа запального інфільтрату посттравматичної ділянки кістки становила $(83,75 \pm 2,205) \%$. Площа грануляційної тканини займала $(16,25 \pm 2,205) \%$ від усієї зони остеорепації (рис. 3.2.3).

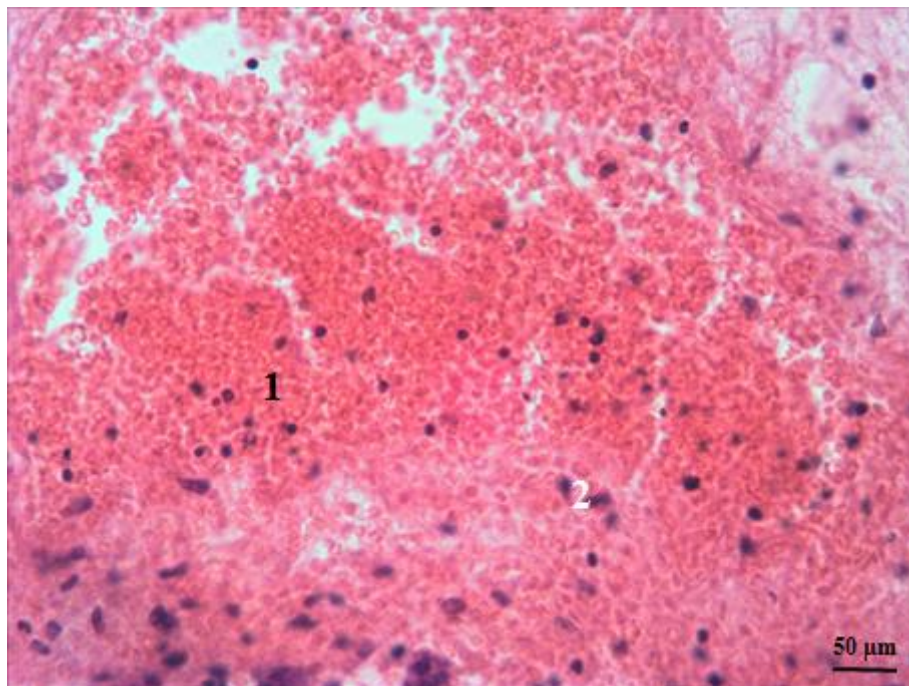


Рисунок 3.2.1 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із змодельованою хронічною гіперглікемією на 3-тю добу репаративного остеогенезу. Еритроцити (1), фіброblastи (2), фібрин (3), лейкоцитарно-лімфоцитарний інфільтрат (4). Забарвлення гематоксиліном і еозином. 3б. x 400

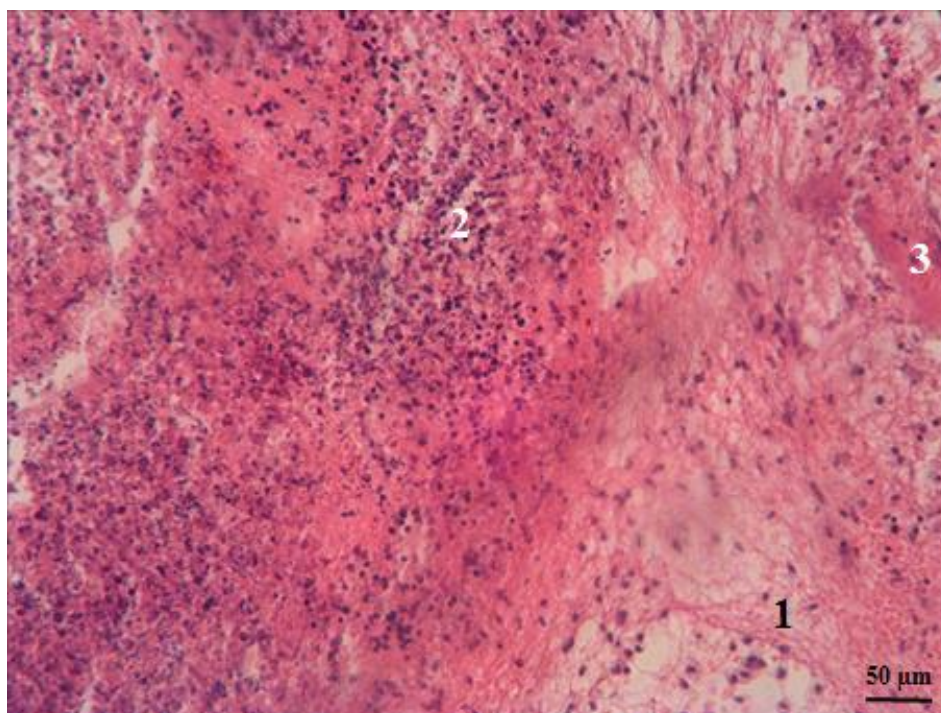


Рисунок 3.2.2 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 3-тю добу репаративного остеогенезу. Фібрин (1), лімфоцити (2), кістковий детрит (3). Зabarвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

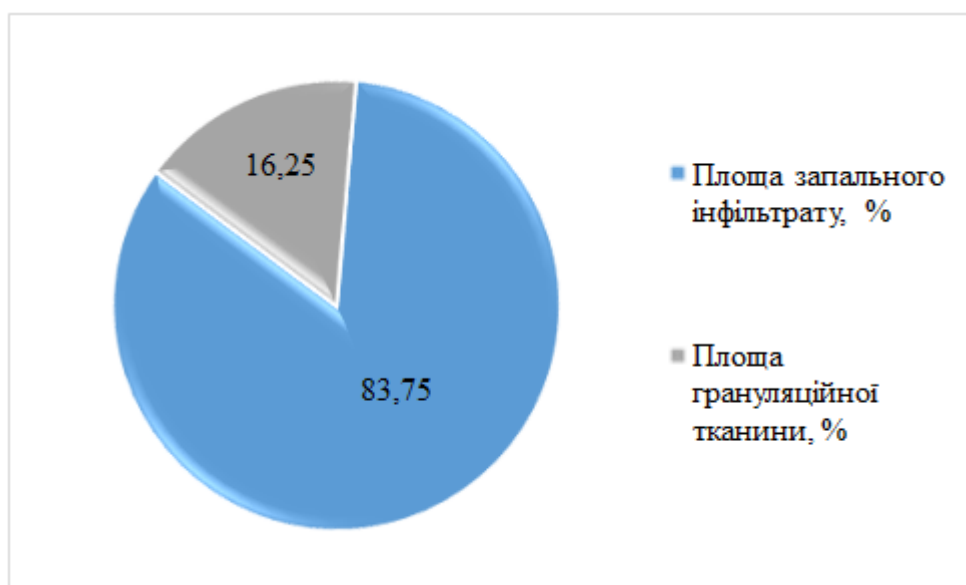


Рисунок 3.2.3 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією на 3-тю добу дослідження

Хіміко-аналітичне дослідження регенерату на 3-тю добу остеогенезу у щурів із змодельованою ХГ показало, що вміст натрію становив $(3,91 \pm 0,37)$ мг/г, калію – $(0,73 \pm 0,11)$ мг/г, кальцію – $(0,81 \pm 0,04)$ мг/г, заліза – $(76,15 \pm 8,74)$ мкг/г, магнію – $(1,35 \pm 0,36)$ мг/г, цинку – $(132,58 \pm 5,66)$ мкг/г, міді – $(0,63 \pm 0,12)$ мкг/г (рис. 3.2.4).

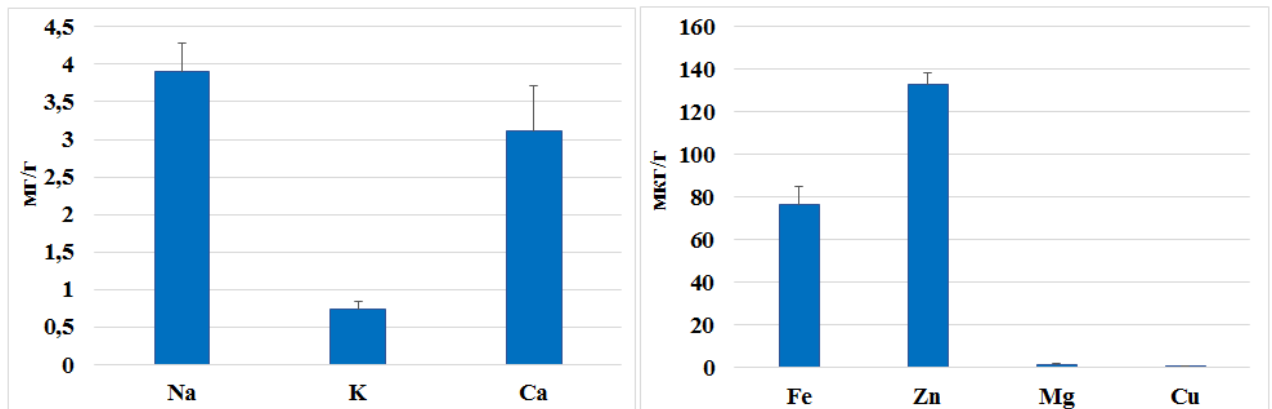


Рисунок 3.2.4 – Показники вмісту макро- та мікроелементів регенерата великогомілкової кістки у щурів із хронічною гіперглікемією на 3-тю добу дослідження

На 7-му добу експерименту ділянка дефекту залишалась заповненою лейкоцитарним запальним інфільтратом, фібрином та кістковим детритом. Але вже відмічалася поява незначних вогнищ сполучної тканини (рис. 3.2.5).

При ультрамікроскопічному дослідженні регенерата на 7-му добу у щурів із змодельованою хронічною гіперглікемією ми виявили фібробласти, цитоплазма, яких містила розвинену ендоплазматичну сітку та комплекс Гольджі. Ядра були заповненні еухроматином та мали центрально розміщене ядро. Також, ми спостерігали зруйновані клітини із початковою фрагментацією ядер (рис. 3.2.6).

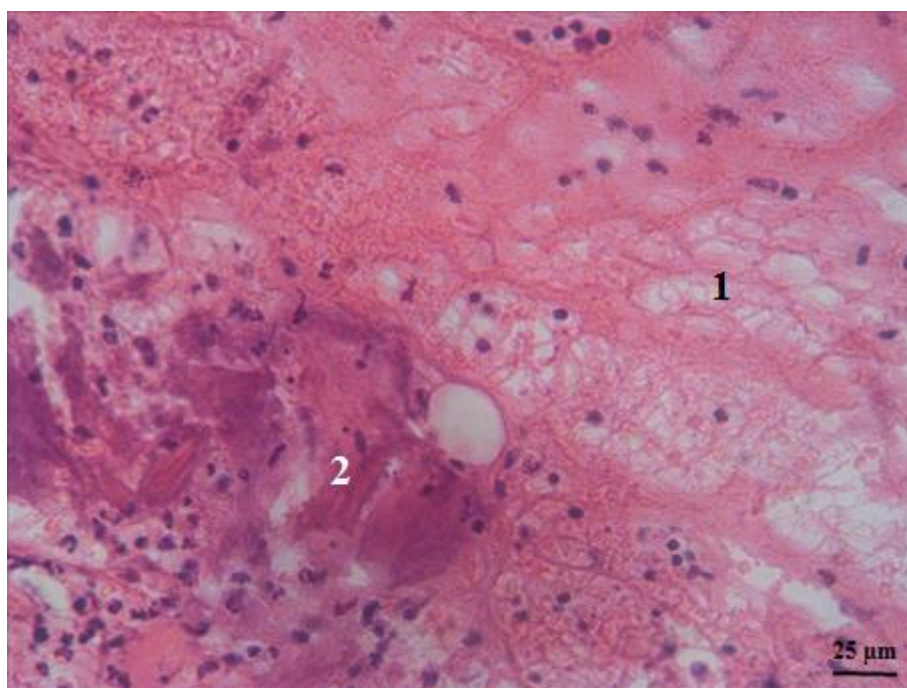


Рисунок 3.2.5 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 7-му добу репаративного остеогенезу. Фібрин (1), кістковий детрит (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400

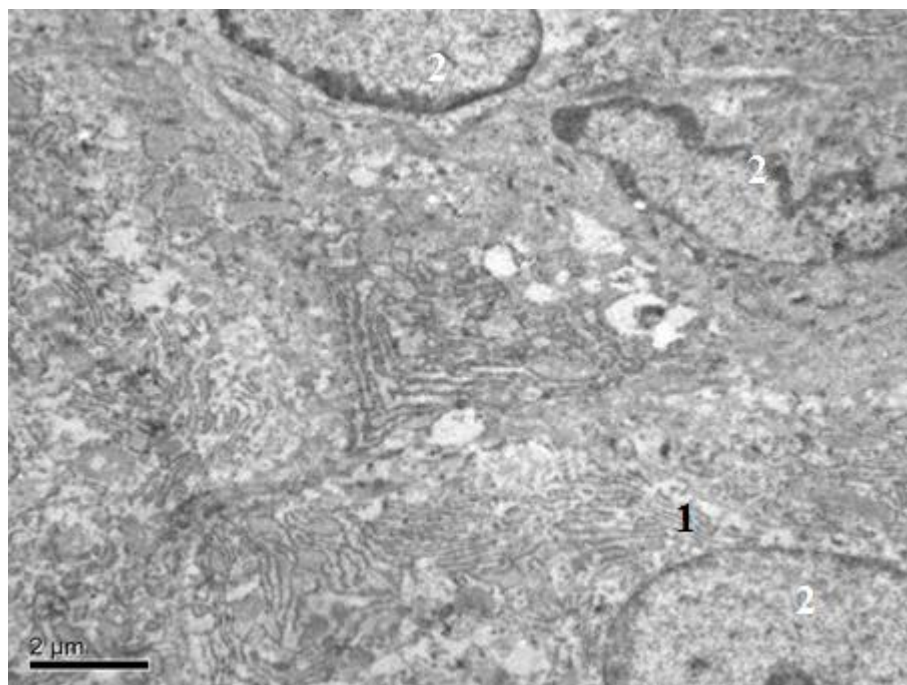


Рисунок 3.2.6 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 7-му добу репаративного остеогенезу. Гранулярна ендоплазматична сітка (1), ядро (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

Площа запального інфільтрату склала ($32,67 \pm 2,62$) %, грануляційної тканини ($59,21 \pm 3,48$) %, а фіброретикулярної сполучної тканини ($8,12 \pm 3,62$) % (рис. 3.2.7).

На 14-ту добу після оперативного втручання дефект був заповнений фіброретикулярною сполучною тканиною. Збільшилась кількість капілярів. Але, на цьому терміні репаративного остеогенезу не відбулось повного очищення від залишків запального інфільтрату. Більшою мірою у центральній частині дефекту спостерігались локальні скупчення нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів, лімфоцитів та жирових клітин. Також, ми спостерігали утворення острівців хрящової тканини у глибоких шарах регенерату (рис. 3.2.8 – 3.2.10).

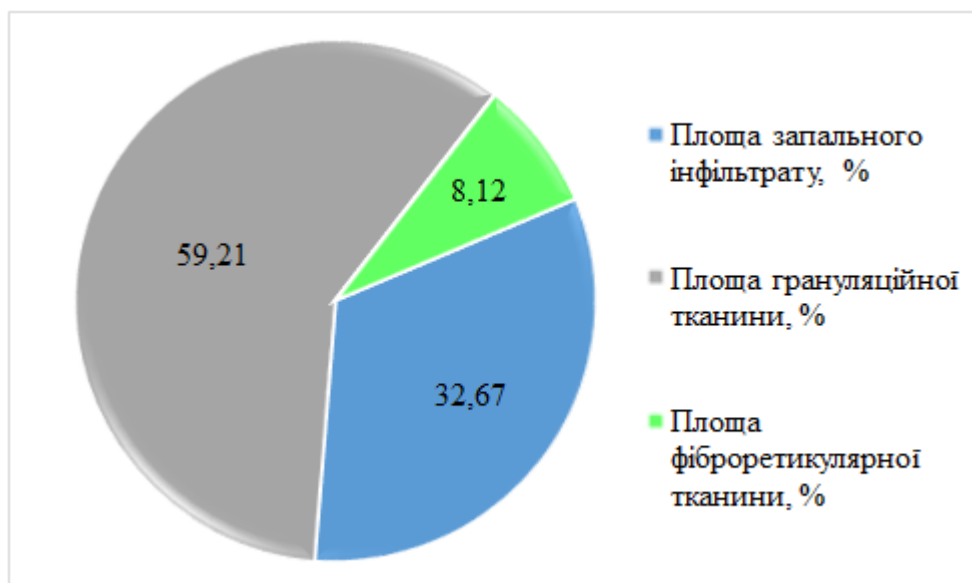


Рисунок 3.2.7 – Площі тканиноспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією на 7-му добу дослідження

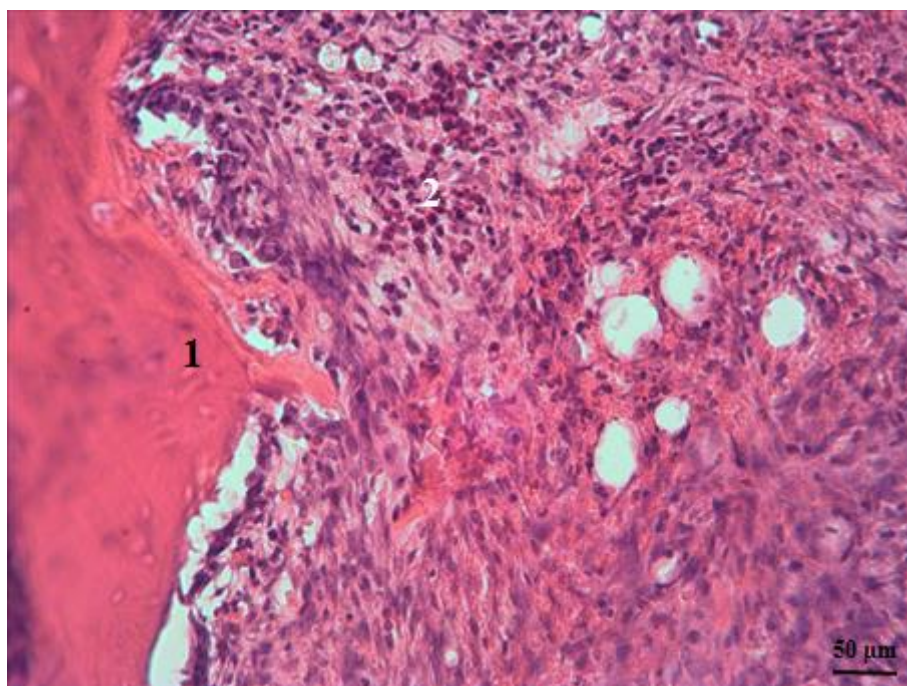


Рисунок 3.2.8 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Материнська кістка (1), нейтрофіли (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

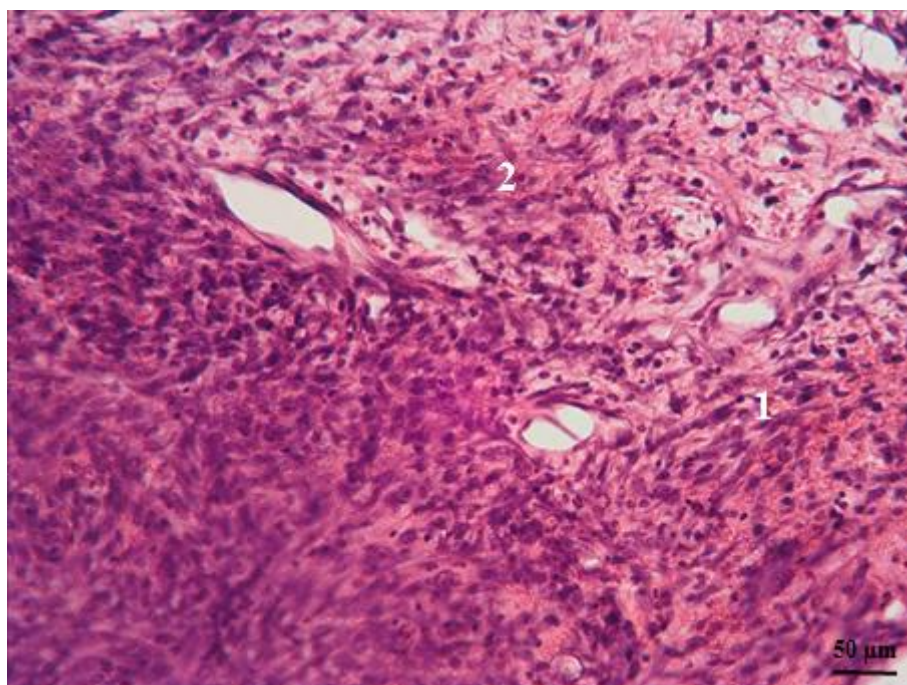


Рисунок 3.2.9 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Фібробласти (1), пучки колагенових волокон (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

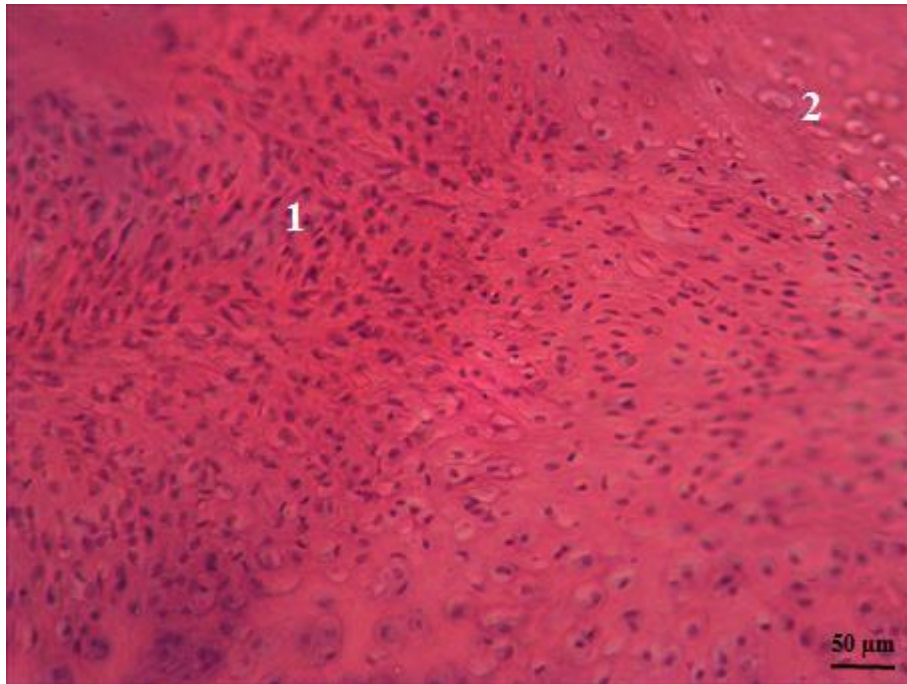


Рисунок 3.2.10 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Фібробласти (1), хондроцити (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

При дослідженні регенерату на ультрамікроскопічному рівні на 14-ту добу експерименту нами було виявлено фібробласти в оточенні матрикса, який складався з пучків щільно розміщених колагенових волокон. Крім того, були виявлені залишки зруйнованих клітин із пікнотичними ядрами та лізованою плазмолемою. Навколо клітин спостерігалися органели, розірвані цистерни ендоплазматичного ретикулула. Локально у матриксі були виявлені пустоти (рис. 3.2.11).

На електронних сканограмах кісткового регенерату на 14-ту добу дослідження у групі тварин із змодельованою хронічною гіперглікемією спостерігались скупчення клітин круглої форми з багаточисленними тонкими відростками. У проміжках між клітинними конгломератами знаходилися поодинокі деформовані еритроцити та тонкі волокна (рис. 3.2.12).

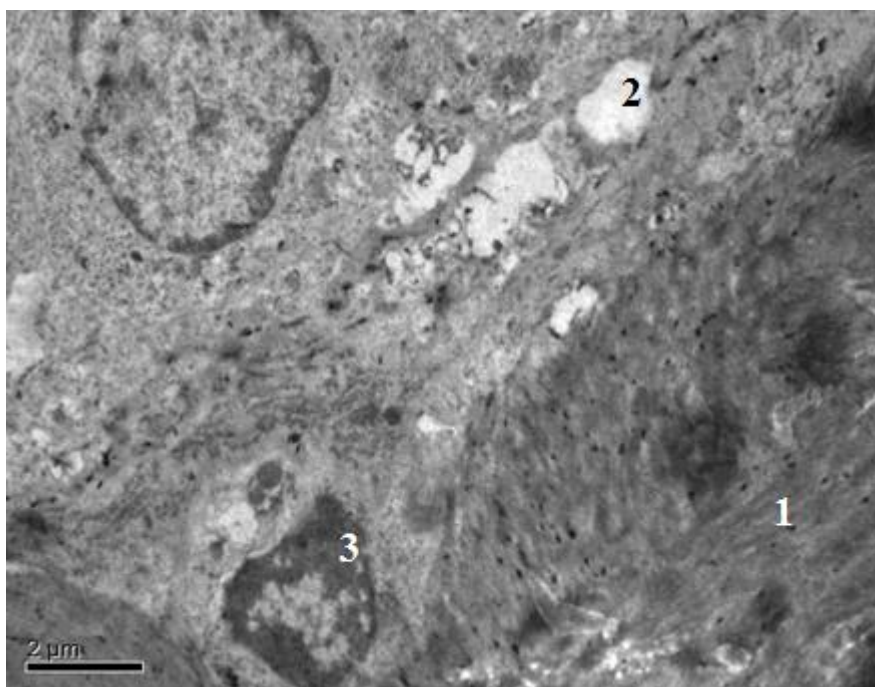


Рисунок 3.2.11 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Пучки колагенових волокон (1), пустоти в матриці (2), ядро (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

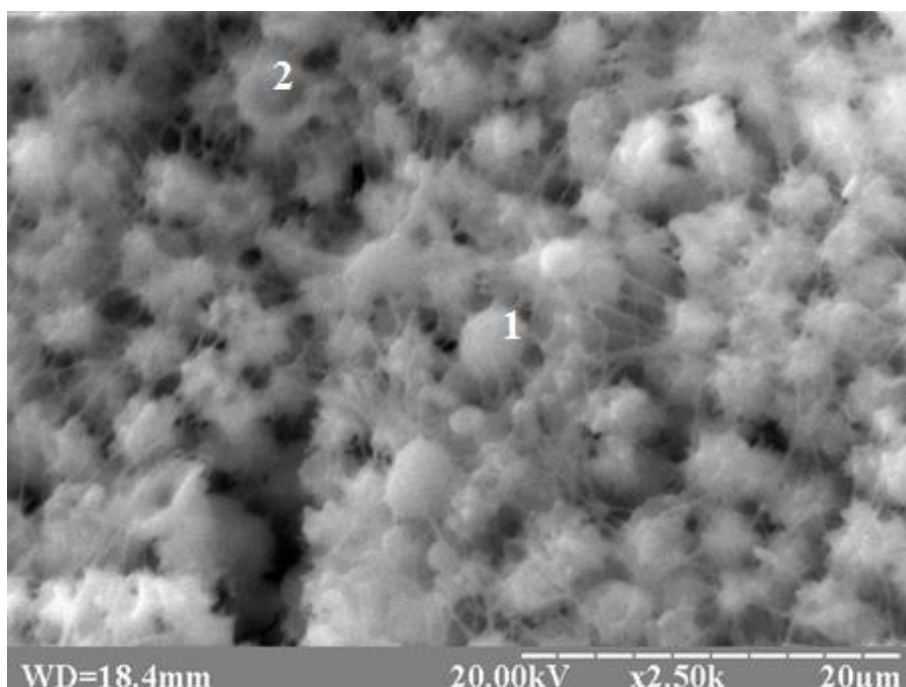


Рисунок 3.2.12 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Фібробласти (1), деформовані еритроцити (2). Електронна сканограма

При морфометричному дослідженні на 14-ту добу експерименту у щурів із хронічною гіперглікемією площа запального інфільтрату становила $(8,37 \pm 0,86)$ % від усієї площі регенерату, а хрящової тканини $(7,96 \pm 2,51)$ %. Площа грануляційної та фіброретикулярної тканини склала $(9,99 \pm 0,7)$ % та $(73,68 \pm 2,25)$ % відповідно (рис. 3.2.13).

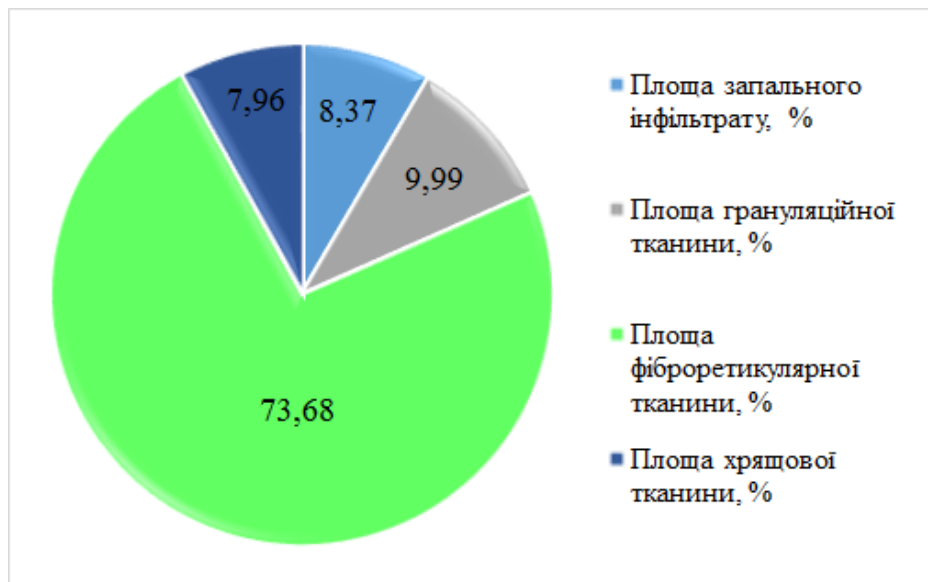


Рисунок 3.2.13 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу дослідження

На 21-шу добу репаративного остеогенезу у групі щурів із хронічною гіперглікемією тільки почалось формування тонких остеогенних трабекул. Вони мали осередкове, нерівномірне розміщення, нещільну та переривисту структуру. Крім того, регенерат характеризувався наявністю жирових клітин та локальною лімфоцитарно-лейкоцитарною інфільтрацією. У глибоких шарах регенерату у кісткових трабекулах спостерігались хондроцити, які розміщувалися переважно поодинокі, лише місцями виявлялися їх групи (рис. 3.2.14-3.2.15).

На 21-шу добу експерименту регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією складався із $(4,52 \pm 0,67)$ % запального інфільтрату, $(49,86 \pm 0,67)$ % фіброретикулярної тканини, $(28,42 \pm 1,3)$ % ретикулофіброзної кісткової тканини та із $(17,19 \pm 1,3)$ % хрящової тканини (рис. 3.2.16).

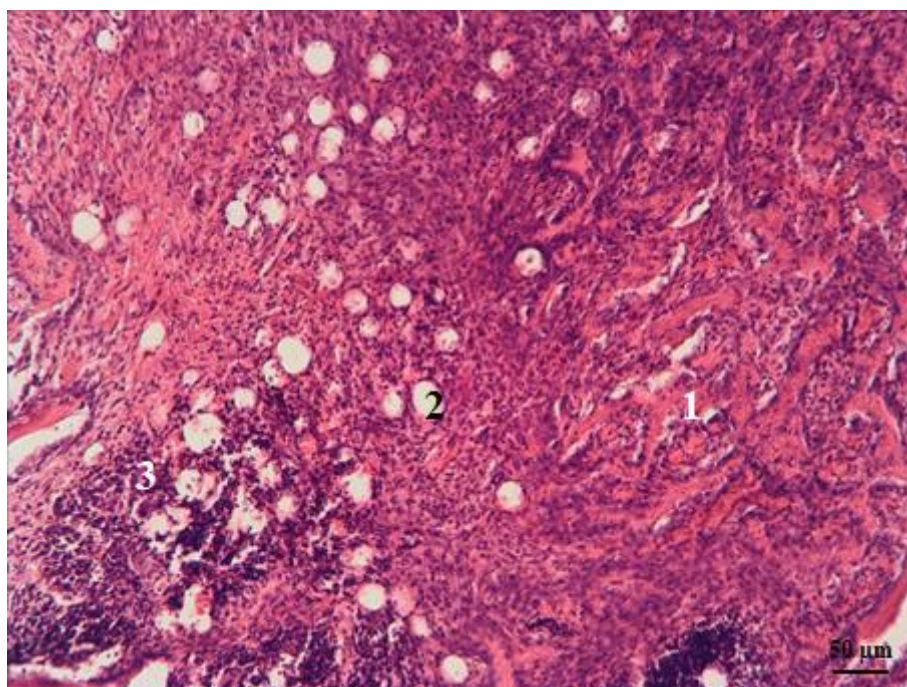


Рисунок 3.2.14 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу репаративного остеогенеза. Остеогенні балки (1), жирові клітини (2), лімфоцитарно-лейкоцитарна інфільтрація (3). Збарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 100

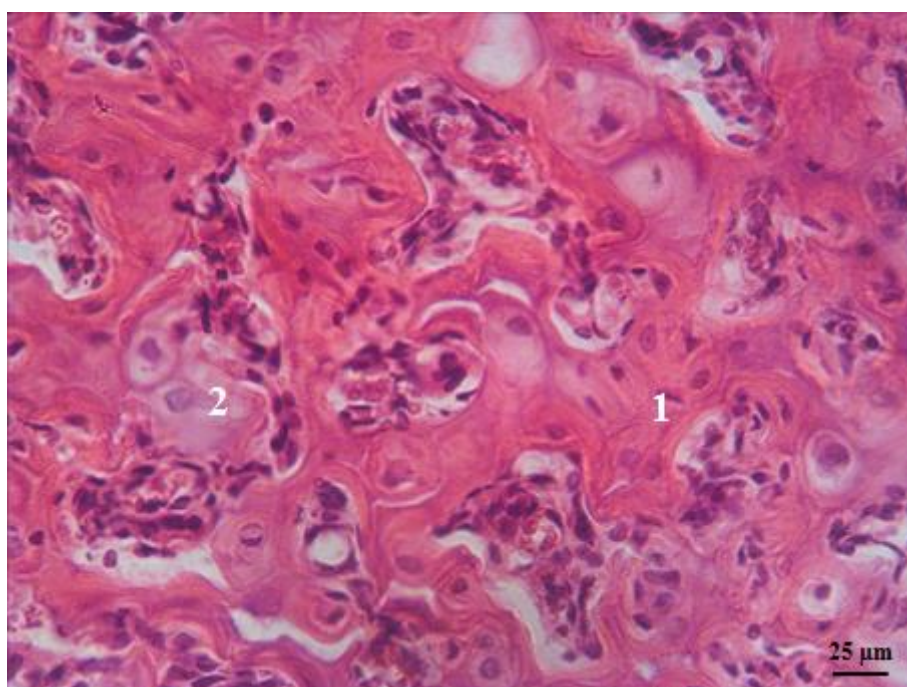


Рисунок 3.2.15 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу репаративного остеогенеза. Кісткові трабекули (1), хондроцити (2). Збарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400

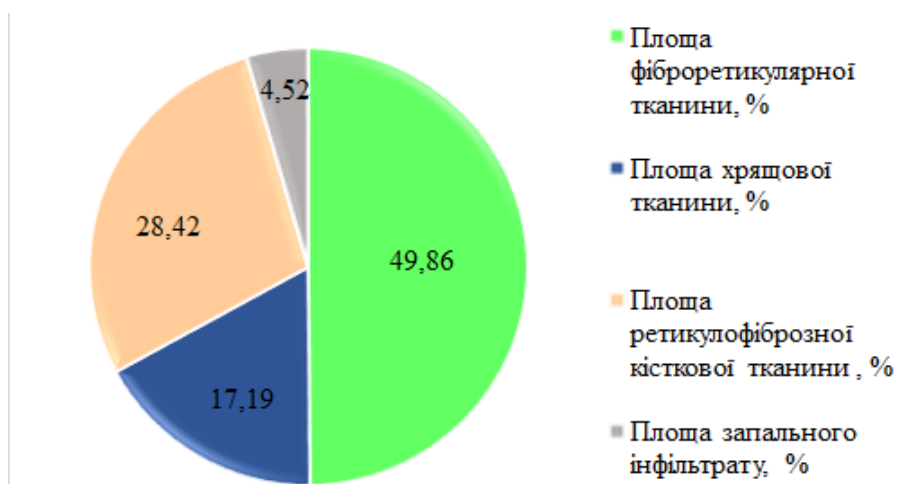


Рисунок 3.2.16 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу дослідження

На електронних сканограмах поверхні дефекту великогомілкової кістки на 21-шу добу експерименту ми спостерігали мережу незрілих ретикулофіброзних кісткових трабекул в оточенні клітин фібробластичного та остеобластичного диферонів (3.2.17).

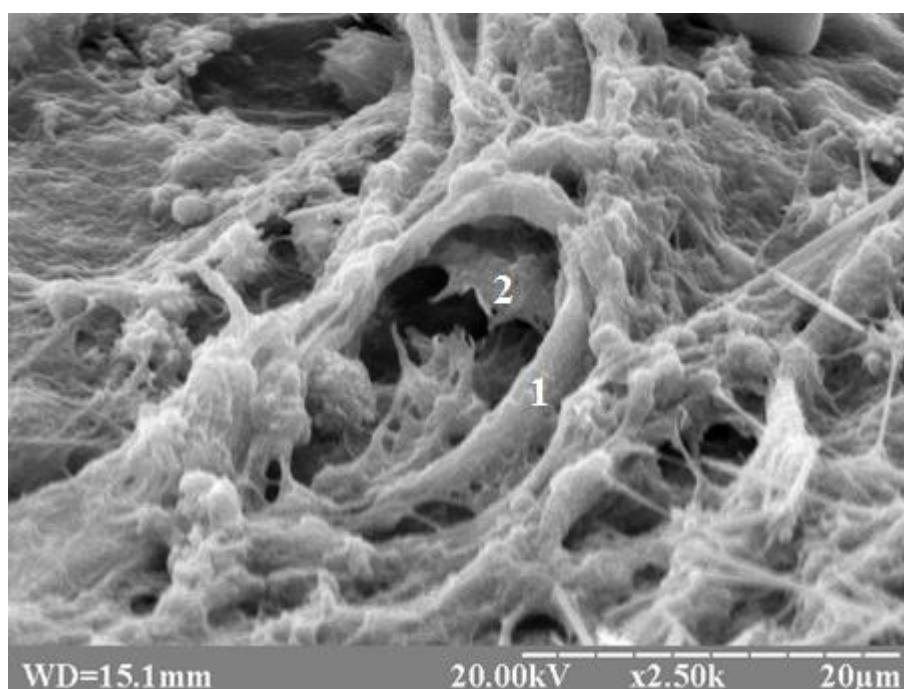


Рисунок 3.2.17 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу репаративного остеогенеза. Кісткові балки (1), клітини кісткового мозку (2). Електронна сканограма

На 21-шу добу експерименту у регенераті кістки щурів із хронічною гіперглікемією на ультратонких зрізах ми спостерігали крім фібробластів та хондроцитів, сегментоядерні нейтрофіли. Цитоплазма містила велику кількість електроннощільних гранул, везикул та кристалоїдів (рис. 3.2.18). Хондроцити мали ядра розташовані здебільшого ексцентрично, а деякі клітини містили пікнотичні ядра, розширений перинуклеарний простір, великий об'єм цитоплазми та поодинокі навколоядерні темні включення.

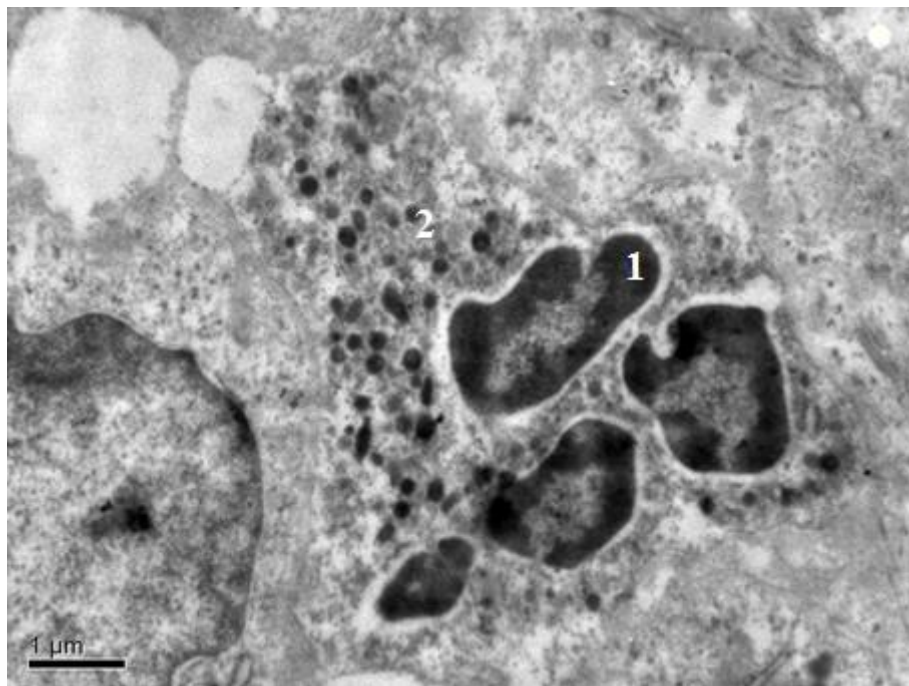


Рисунок 3.1.18 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу репаративного остеогенеза. Ядро нейтрофіла (1), гранули (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

На 30-ту добу репаративного остеогенезу у групі щурів із хронічною гіперглікемією продовжувалось утворення остеогенних балок, різних за розмірами, із вузькими проміжками між трабекулами та незначною кількістю клітин кісткового мозку. Біля материнської кістки їх формування проходило більш структуровано. Траплялися ділянки, де балки неповністю

сформовані та не сполучені між собою. У центральній частині дефекту вони мали нерівномірну товщину й дезорганізоване розміщення. Крім того, в цій групі тварин спостерігалось локальне заміщення дефекту хрящовою тканиною в оточенні фіброретикулярної тканини. Формування повноцінної зрілої пластинчастої кістки в цій групі спостереження не відбулося. Спостерігалися лише поодинокі нові остеони з Гаверсовими каналами в острівцях нової пластинчастої кістки (рис. 3.2.19 – 3.2.20).

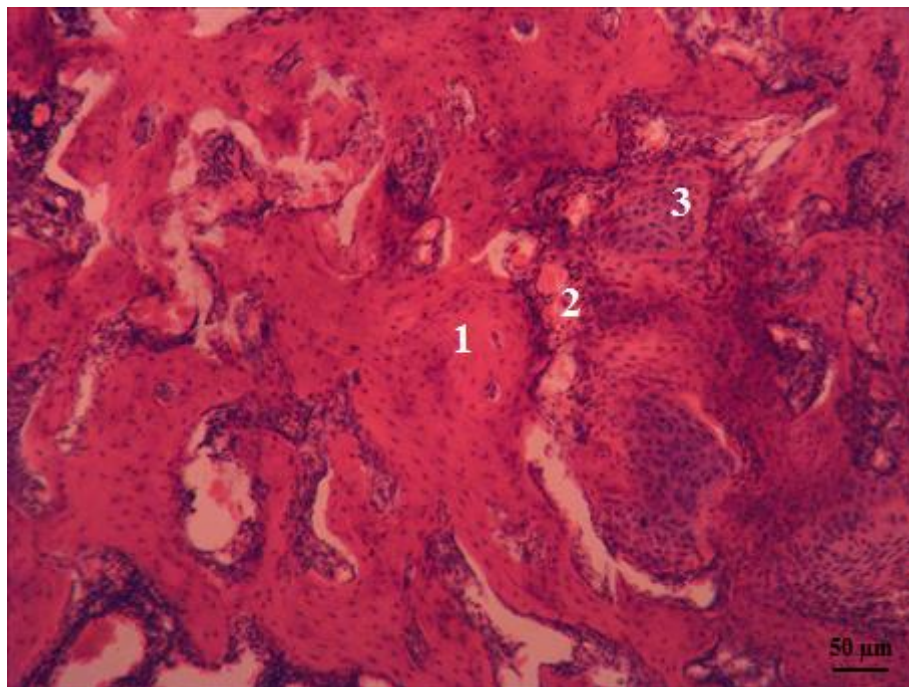


Рисунок 3.2.19 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 30 добу репаративного остеогенеза. Остеогенні трабекули (1), капіляр (2), хондрогенні острівці (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

На електронних сканограмах поверхня ділянки дефекту мала численні міжтрабекулярні проміжки, заповнені клітинами та сполучнотканинним матриксом. Добре візуалізувалася волокниста структура остеогенних балок. Формування повноцінного окістя новоутвореної кістки в цій групі не відбулося (рис. 3.2.21 – 3.2.22).

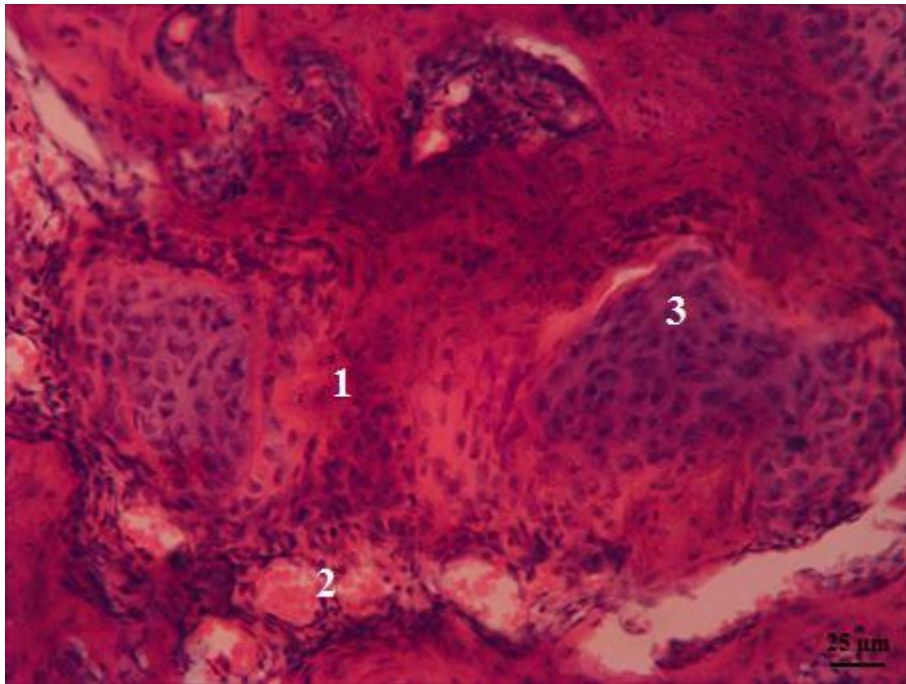


Рисунок 3.2.20 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 30 добу репаративного остеогенеза. Остеогенні трабекули (1), капіляр (2), хондрогенні острівці (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400

На 30-ту добу після травми регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією складався із $(61,54 \pm 2,01)$ % ретикулофіброзної кісткової тканини, $(28,22 \pm 1,42)$ % фіброретикулярної та $(10,24 \pm 3,37)$ % хрящової тканини (рис. 3.2.23).

При дослідженні на ультрамікроскопічному рівні у кінці експерименту ми спостерігали поодинокі клітини, імовірно остецити, які були занурені у матрикс. Клітини мали центрально розміщене ядро з інвагінаціями каріолеми, грудками гетерохроматину. Цитоплазма містила незначну кількість дрібних із щільним матриксом мітохондрії. У навколклетинному просторі спостерігалось локальне просвітлення матрикса та пучки колагенових волокон. Також, у регенераті були виявлені фібробласти на різних стадіях їх руйнування (рис. 3.2.24).

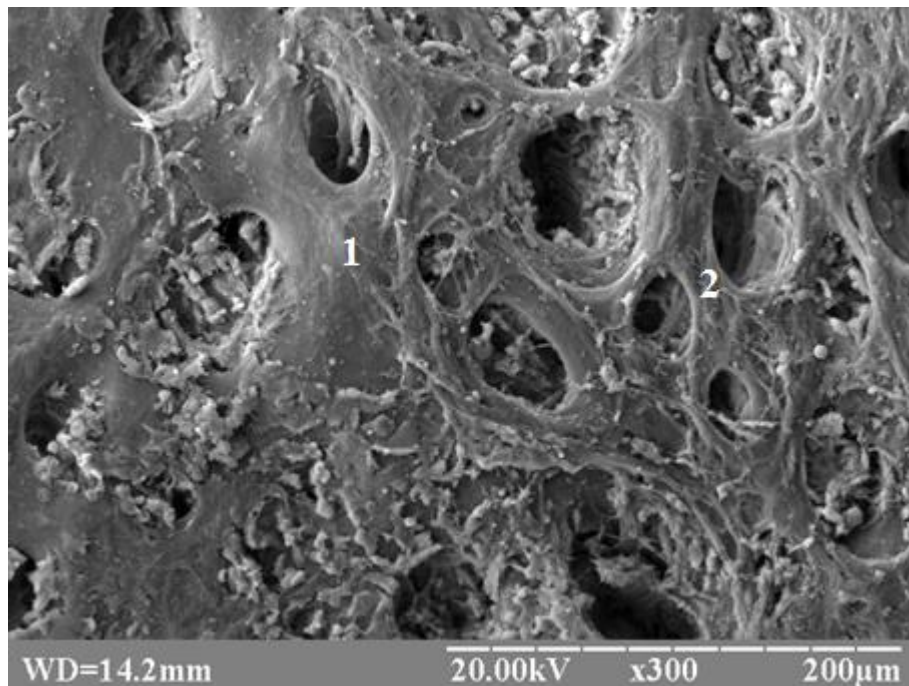


Рисунок 3.2.21 – Поверхня ділянки дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 30-ту добу репаративного остеогенеза. Кісткові трабекули (1), міжтрабекулярні проміжки (2). Електронна сканограма

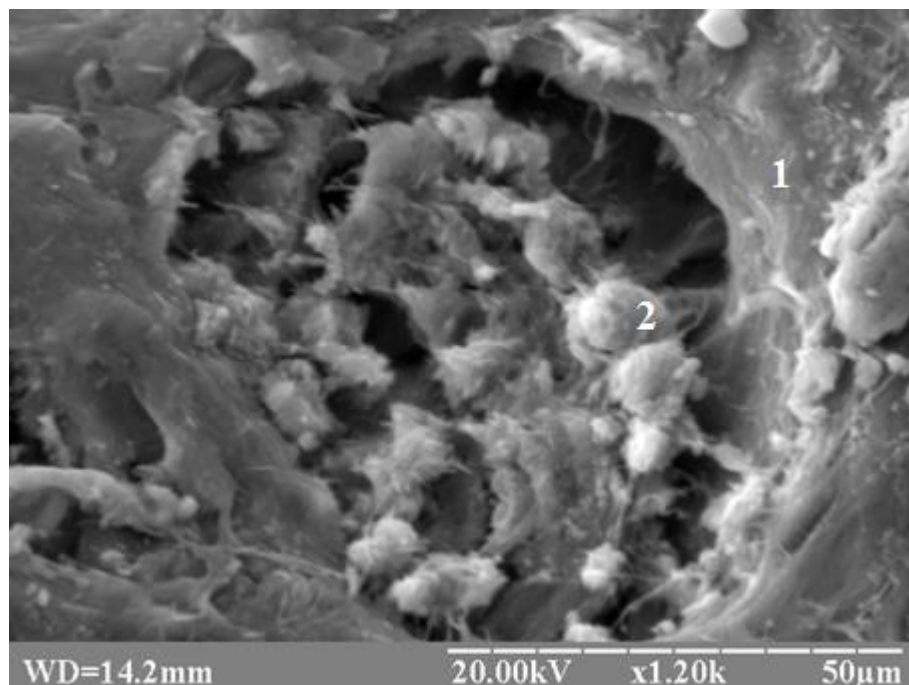


Рисунок 3.2.22 – Поверхня ділянки дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 30-ту добу репаративного остеогенеза. Кісткові трабекули (1), клітини кісткового мозку (2). Електронна сканограма

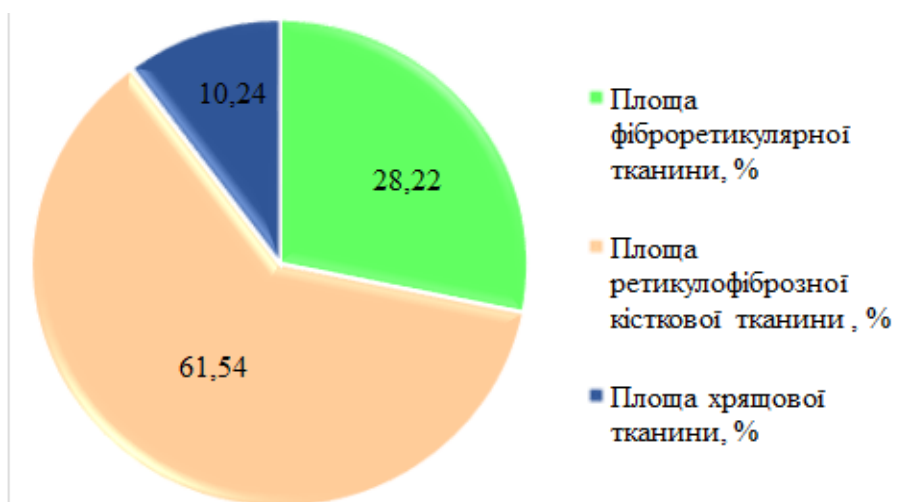


Рисунок 3.2.23 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією на 30-ту добу дослідження

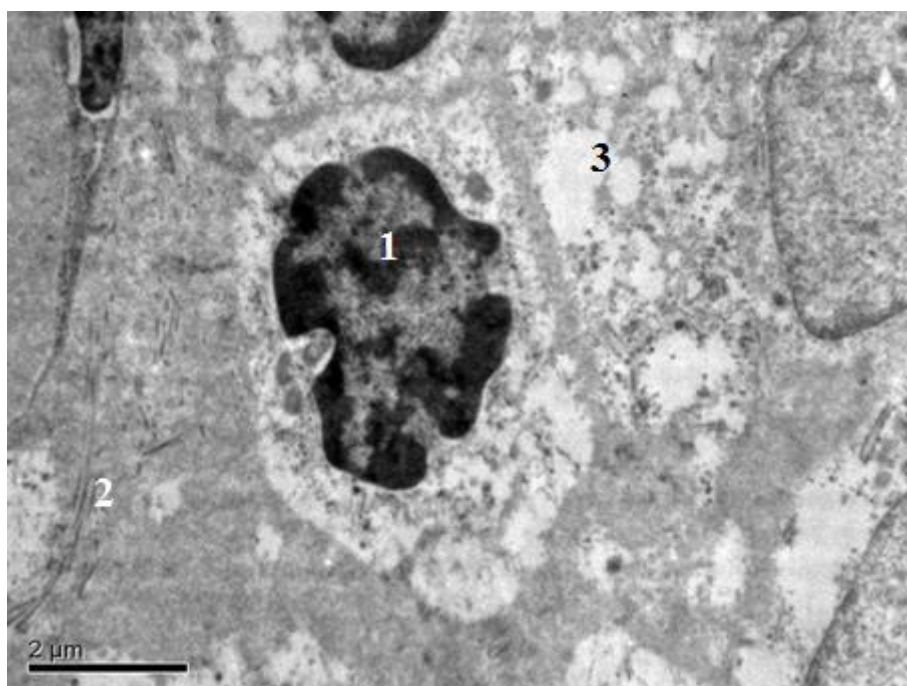


Рисунок 3.2.24 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 30-ту добу репаративного остеогенеза. Ядро остеоцита (1), колагенові волокна (2), пустоти у матриксі (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

Результати вивчення вмісту хімічних елементів у регенераті на 30-ту добу остеогенезу показали, що вміст натрію становив $(2,59 \pm 0,19)$ мг/г, калію – $(1,28 \pm 0,13)$ мг/г, кальцію – $(3,51 \pm 0,49)$ мг/г, заліза – $(35,47 \pm 4,05)$ мкг/г, магнію – $(1,89 \pm 0,28)$ мг/г, цинку – $(73,13 \pm 7,51)$ мкг/г, міді – $(0,42 \pm 0,08)$ мкг/г (рис. 3.2.25).

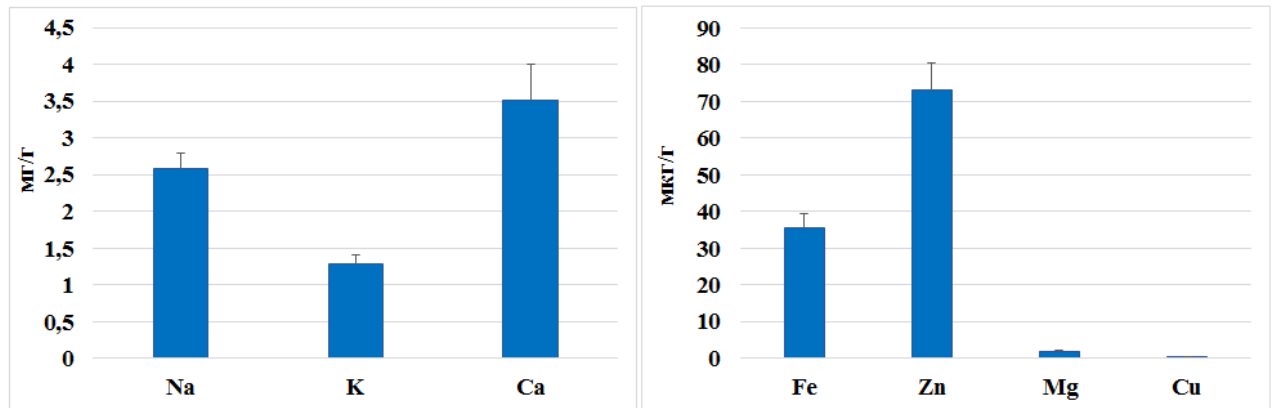


Рисунок 3.2.25 – Показники вмісту макро- та мікроелементів регенерата великогомількової кістки у щурів із хронічною гіперглікемією на 30-ту добу дослідження

Отже, ранні стадії репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією характеризувалися послабленням процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату, затриманням розвитку грануляційної тканини. На пізніх стадіях ХГ призводить до порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату. Формування зрілої пластинчастої кістки не відбулося. Крім того відбувається затримка ліквідації запалення у місці кісткового дефекту, що робить процес репаративного остеогенезу більш тривалишим. Також, на початку остеогенезу за умов впливу ХГ, у регенераті спостерігалось збільшення концентрації натрію на 115,78 % ($p < 0,001$), кальцію – на 46,42 % ($p = 0,013$), заліза – на 93,71 % ($p < 0,001$), цинку – на 62,99 % ($p < 0,001$) та міді – на 128,36 % ($p < 0,001$). У кінці експерименту спостерігалось зменшення концентрацій зазначених елементів, однак рівня контрольних показників вони не досягли. Вміст кальцію був менше на 17,92 % ($p = 0,001$) відповідно контрольної групи.

Основні результати розділу опубліковані у працях [102, 105, 106, 108-110, 112, 113].

3.3 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза довгих кісток скелета щурів за умов хронічної гіперглікемії та при застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми

На 3-тю добу вивчення репаративного остеогенезу у щурів із хронічною гіперглікемією та застосуванням збагаченої тромбоцитами плазми місце дефекту було заповнено еритроцитами, лімфоцитами, нейтрофільними гранулоцитами, макрофагами, ліпоцитами, фібрином, залишками кісткового мозку та зруйнованими тромбоцитами. Під ендостом материнської кістки спостерігалися залишки кісткового детриту (рис. 3.3.1 – 3.3.2).

Регенерат на 3-тю добу дослідження у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП складався із $(80,26 \pm 1,35)$ % запального інфільтрату та $(19,74 \pm 1,35)$ % грануляційної тканини (рис. 3.3.3 та табл. 3.1).

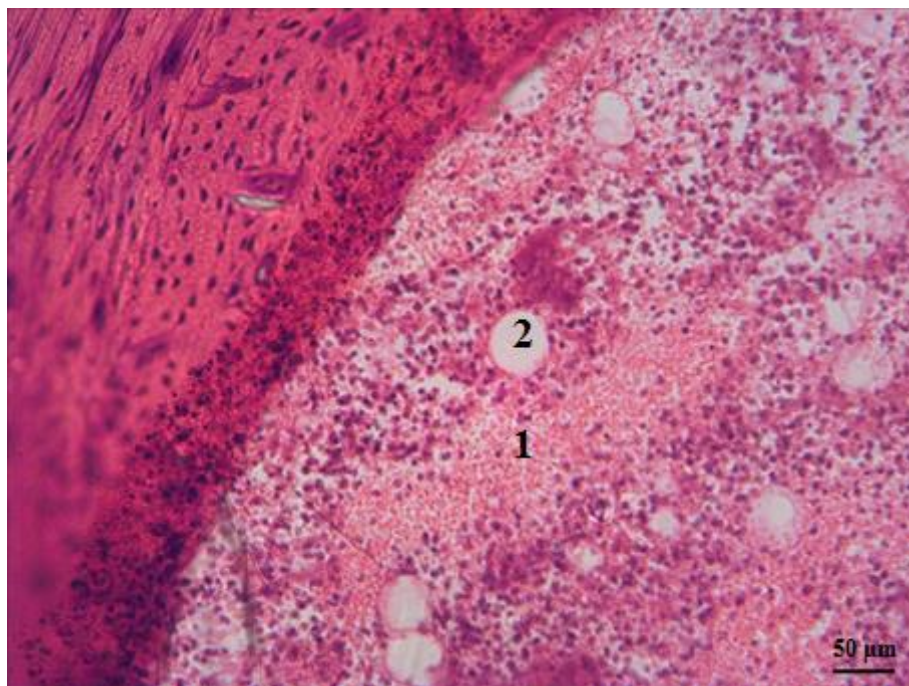


Рисунок 3.3.1 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 3-тю добу репаративного остеогенеза. Еритроцити (1), ліпоцити (2). Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

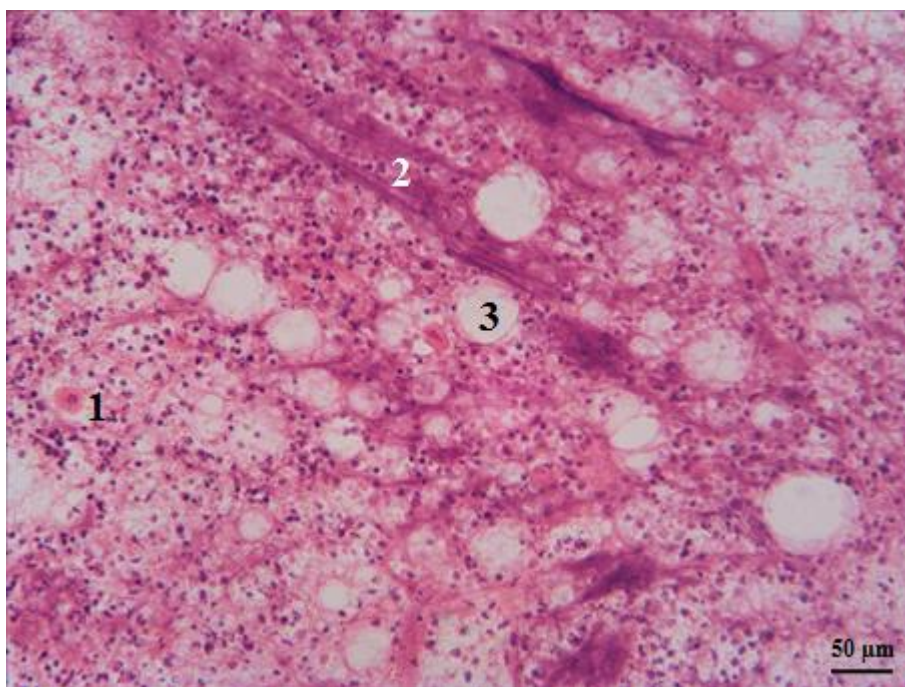


Рисунок 3.3.2 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 3-тю добу репаративного остеогенеза. Макрофаг (1), нитки фібрину (2), ліпоцити (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

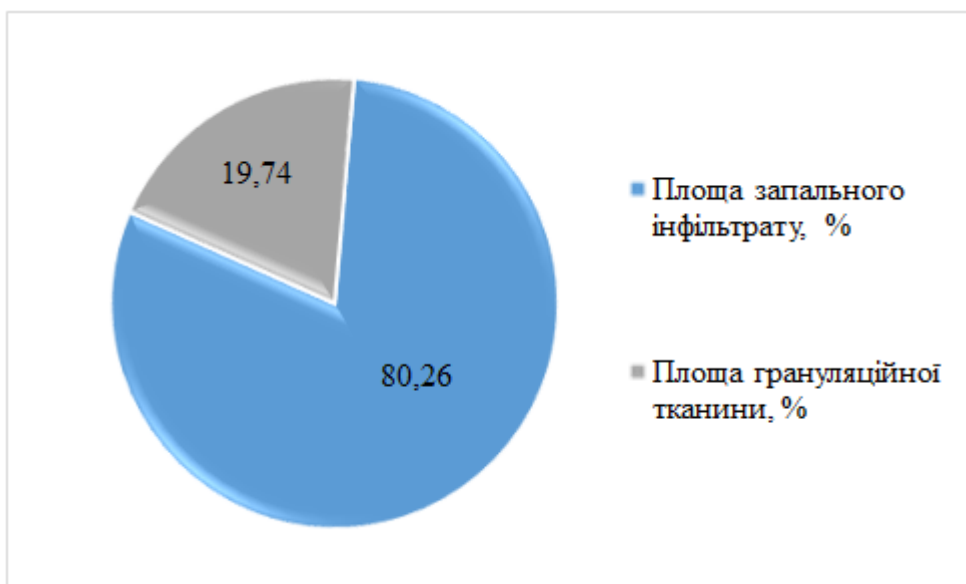


Рисунок 3.3.3 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 3-тю добу дослідження

Таблиця 3.1

Показники площ тканинспецифічних структур регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 3 добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ + ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Площа запального інфільтрату, мм ²	1,24 ± 0,05	1,49 ± 0,04	1,42 ± 0,04	<0,001	<0,001	<0,001	=0,002
Площа грануляційної тканини, мм ²	0,49 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,03	<0,001	<0,001	<0,001	=0,002

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

Хіміко-аналітичний аналіз регенерата у щурів із змодельованою ХГ, яким вводили ЗТП на 3-тю добу остеогенезу показав, що вміст натрію становив (2,45 ± 0,39) мг/г, калію – ((1,18 ± 0,08) мг/г, кальцію – (1,63 ± 0,33) мг/г, заліза – (50,52 ± 7,49) мкг/г, магнію – (1,49 ± 0,33) мг/г, цинку – (128,12 ± 17,73) мкг/г, міді – (0,54 ± 0,08) мкг/г (табл. 3.2).

На 7-му добу експерименту в ділянці оперативного втручання зберігались залишкові ознаки запалення. Клітини макрофагально-лейкоцитарного ряду містили у цитоплазмі велику кількість вакуолей. Відмічалось послаблення

процесів утилізації уламків пошкодженої кістки. Разом з тим, збільшувалась кількість фібробластів (рис. 3.3.4).

Таблиця 3.2

Показники хімічних елементів регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 3-тю добу дослідження

Показник	Контроль	ХГ	ХГ+ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Na (мг/г)	1,81 ± 0,05	3,91 ± 0,37	2,45 ± 0,39	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
K (мг/г)	1,92 ± 0,12	0,73 ± 0,11	1,18 ± 0,08	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ca (мг/г)	2,12 ± 0,29	0,81 ± 0,04	1,63 ± 0,33	0,013	0,013	1,000	0,115
Fe (мкг/г)	39,31 ± 1,35	76,15 ± 8,74	50,52 ± 7,49	<0,001	<0,001	0,003	<0,001
Mg (мг/г)	2,63 ± 0,59	1,35 ± 0,36	1,49 ± 0,33	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Zn (мкг/г)	81,34 ± 2,69	132,58 ± 5,66	128,12 ± 17,73	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Cu (мкг/г)	0,28 ± 0,08	0,63 ± 0,12	0,54 ± 0,08	<0,001	<0,001	<0,001	0,136

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

При ультрамікроскопічному дослідженні кісткового регенерата на 7-му добу у щурів із змодельованою ХГ, яким вводили ЗТП з використанням трансмісійного електронного мікроскопа ми виявили залишки зруйнованих тромбоцитів, які мали вигляд великої кількості гранул різної електронної щільності та розмірів. Разом з тим, ми спостерігали сегментоядерні нейтрофіли, цитоплазма яких містила велику кількість темних включень, гранул, лізосом та кристалоїдів. Навколо ядра розміщувалася щільна мережа цистерн ендоплазматичного ретикулума (рис. 3.3.5). Також, ми виявили фібробласти з великим, світлим ядром, яке містило одне, іноді два ядерця. Цитоплазма мала розширені цистерни ендоплазматичного ретикулума з вираженими рибосомами, виражений комплекс Гольджі.

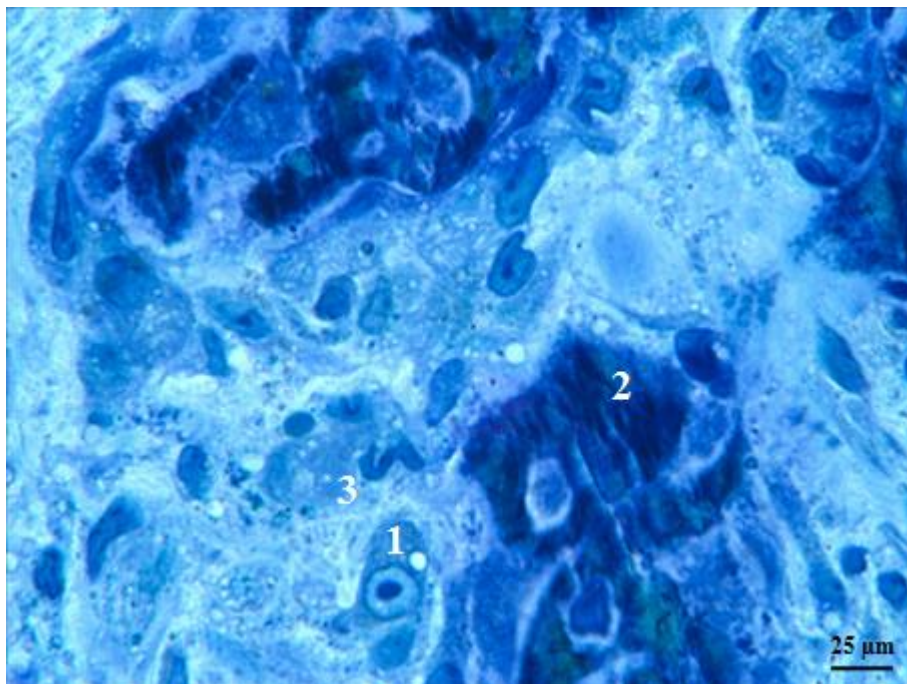


Рисунок 3.3.4 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 7-му добу репаративного остеогенезу. Фібробласти (1), кісткові уламки (2), остеокласт (3). Забарвлення метиленовим синім. Зб. х 400

Регенерат у цій групі тварин складався із $(9,37 \pm 0,53)$ % запального інфільтрату, $(44,96 \pm 1,49)$ % грануляційної та $(45,67 \pm 1,67)$ % фіброретикулярної тканини (рис. 3.3.6 та табл. 3.3).

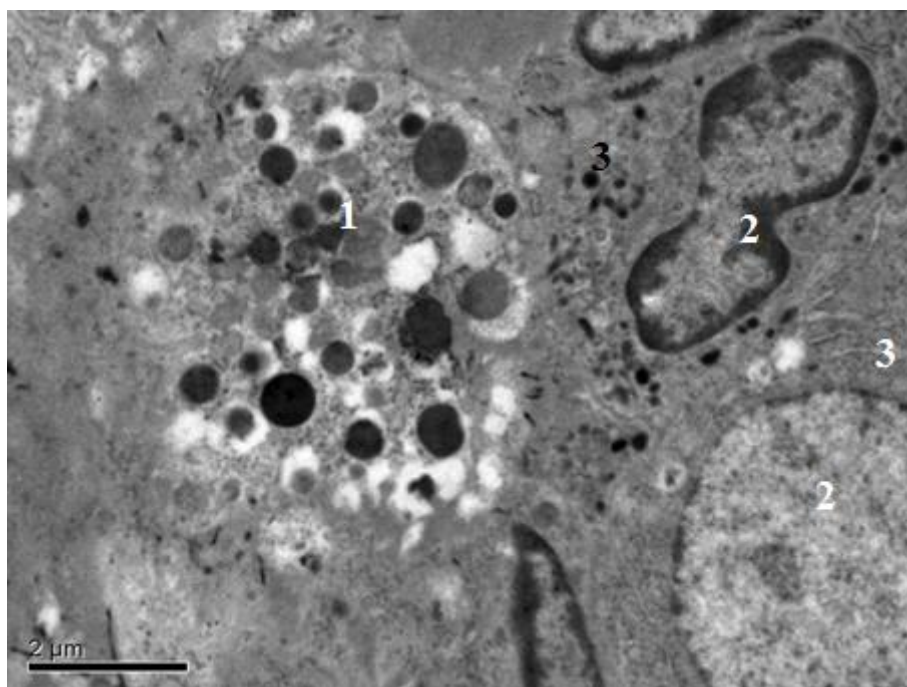


Рисунок 3.3.5 – Ультрaструктурa регенерaтa великогомілкової кістки щурa із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 7-му добу репаративного остеогенеза. Гранули тромбоцитів (1), ядро (2), цистерни ендоплазматичного ретикулума (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

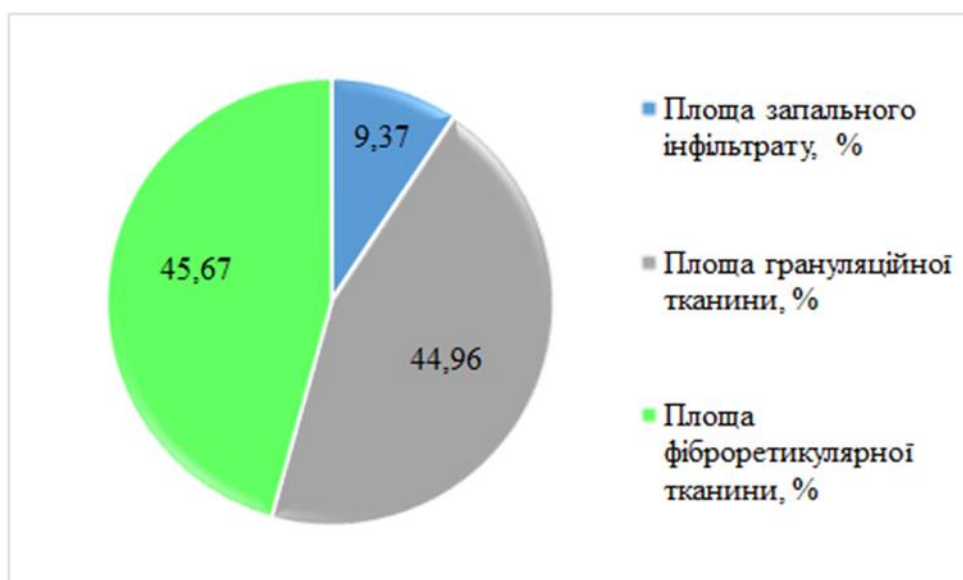


Рисунок 3.3.6 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 7-му добу дослідження

Таблиця 3.3

Показники площ тканиноспецифічних структур регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 7 добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ + ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Площа запального інфільтрату, мм ²	0,04 ± 0,01	0,58 ± 0,05	0,16 ± 0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Площа грануляційної тканини, мм ²	0,89 ± 0,06	1,05 ± 0,07	0,78 ± 0,03	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
Площа фіброретикулярної тканини, мм ²	0,803 ± 0,05	0,14 ± 0,06	0,79 ± 0,04	<0,001	<0,001	1,000	<0,001

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

На 14-ту добу експерименту у тварин відмічалось розростання фіброретикулярної тканини та її упорядкування й трансформація в остеоїдні трабекули. Найінтенсивніше цей процес відбувався біля материнської кістки. У центрі дефекту була зона фіброретикулярної тканини з великою кількістю капілярів синусоїдного типу без утворення кісткових балок (рис. 3.3.7 – 3.3.9).

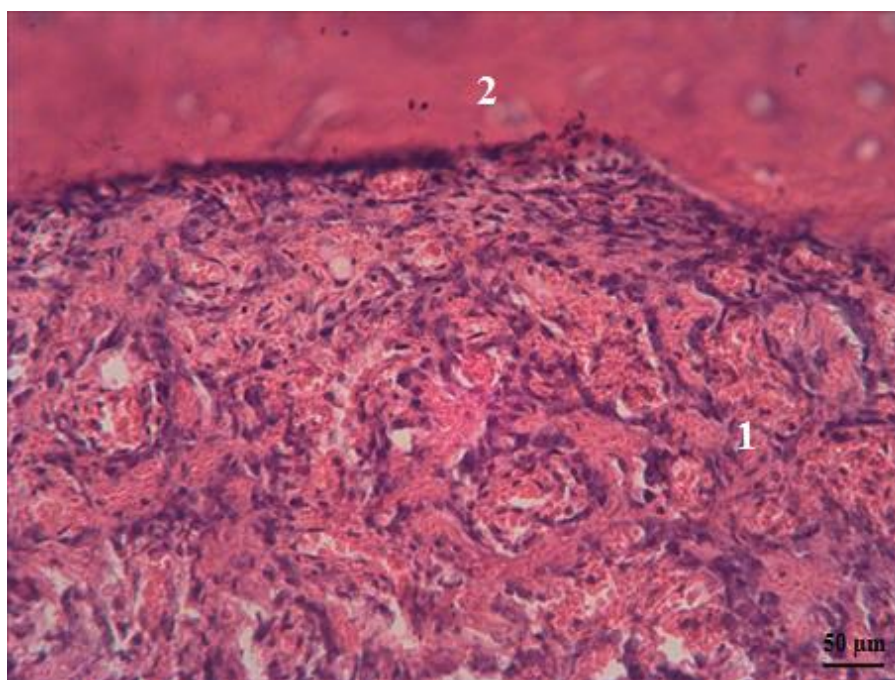


Рисунок 3.3.7 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Osteoїдні трабекули (1), материнська кістка (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

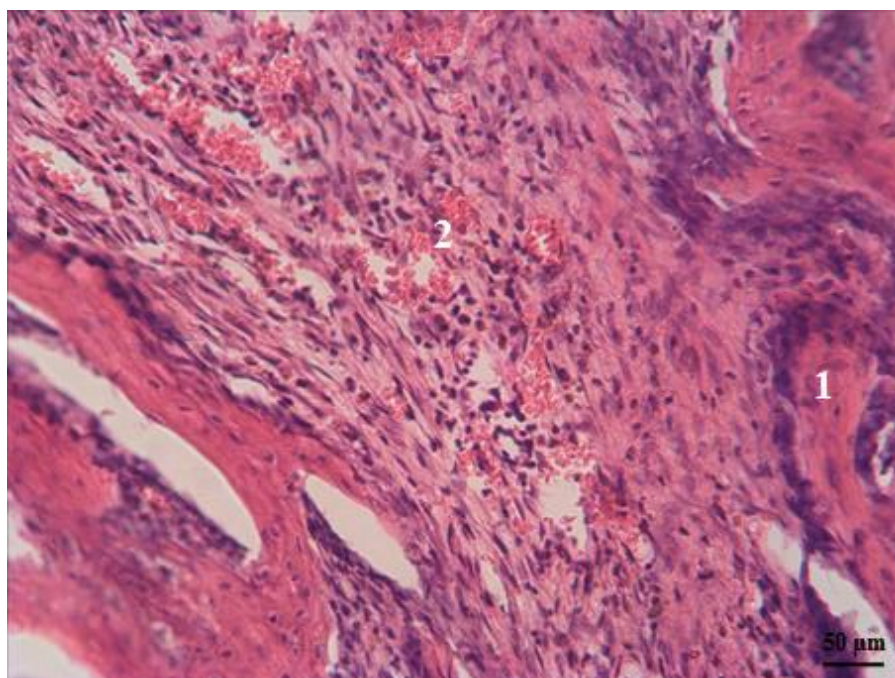


Рисунок 3.3.8 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із змодельованою хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Кісткові трабекули (1), капіляри (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

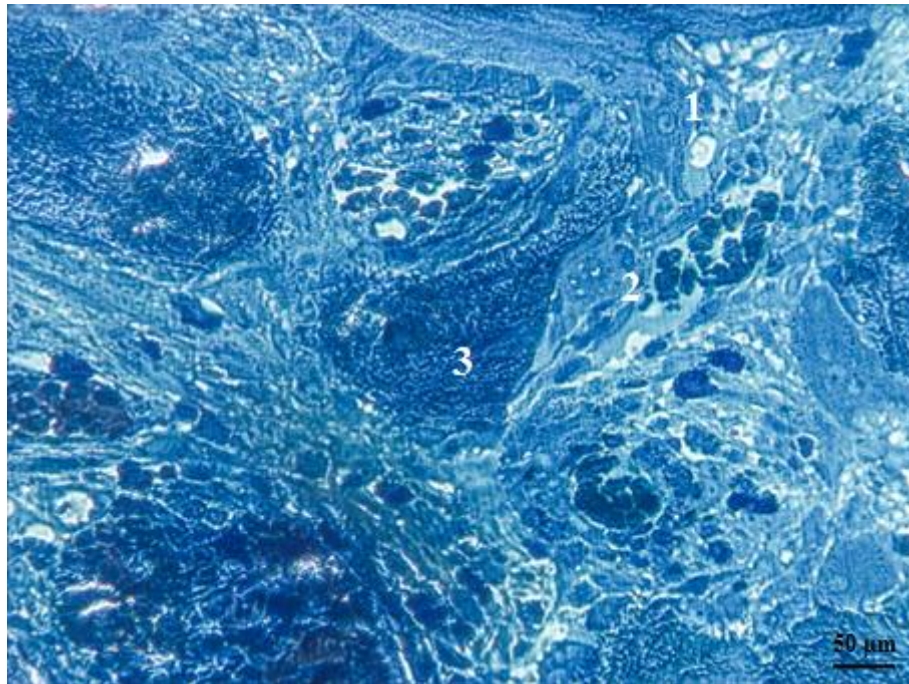


Рисунок 3.3.9 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Osteобласти (1), остеокласт (2), кісткова балка (3). Забарвлення Метиленовим синім. Зб. х 200

На 14-ту добу експерименту на ультратонких зрізах кісткового регенерату ми спостерігали остеобласти, цитоплазма яких містила велику кількість дилатованих цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, які на своїй поверхні мали щільно розміщені виражені рибосоми. Клітини містили розвинений комплекс Гольджі та мітохондрії із матриксом середньої електронної щільності. Крім того, у цитоплазмі виявлялися везикули та темні включення (рис. 3.3.10)

На електронних сканограмах поверхні регенерату спостерігались остеобласти з тонкими довгими відростками в оточенні аморфного матриксу та багаточисленних волокон. Біля материнської кістки були виявлені нові кісткові трабекули з міжтрабекулярними проміжками, які були заповнені клітинами та волокнами (рис. 3.3.11 – 3.3.12).

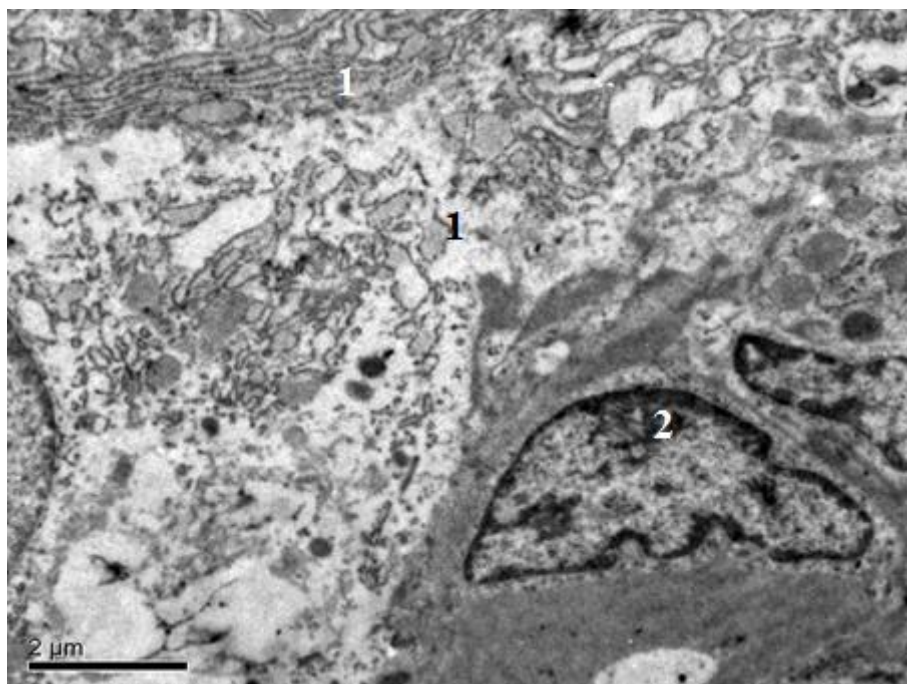


Рисунок 3.3.10 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки (1), ядро (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

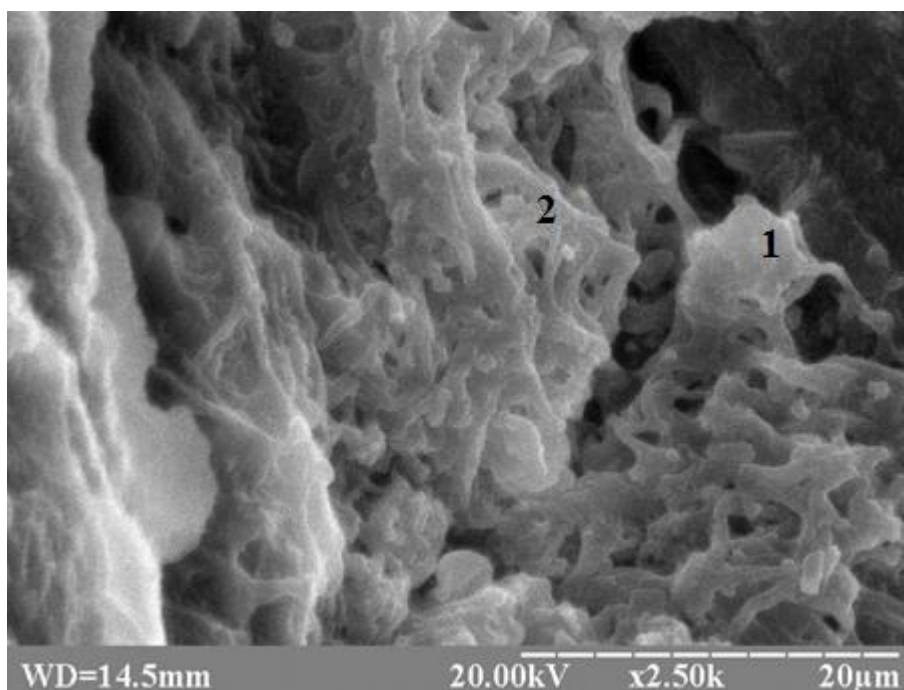


Рисунок 3.3.11 – Поверхня ділянки дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенезу. Остеобласт (1), волокна (2). Електронна сканограма

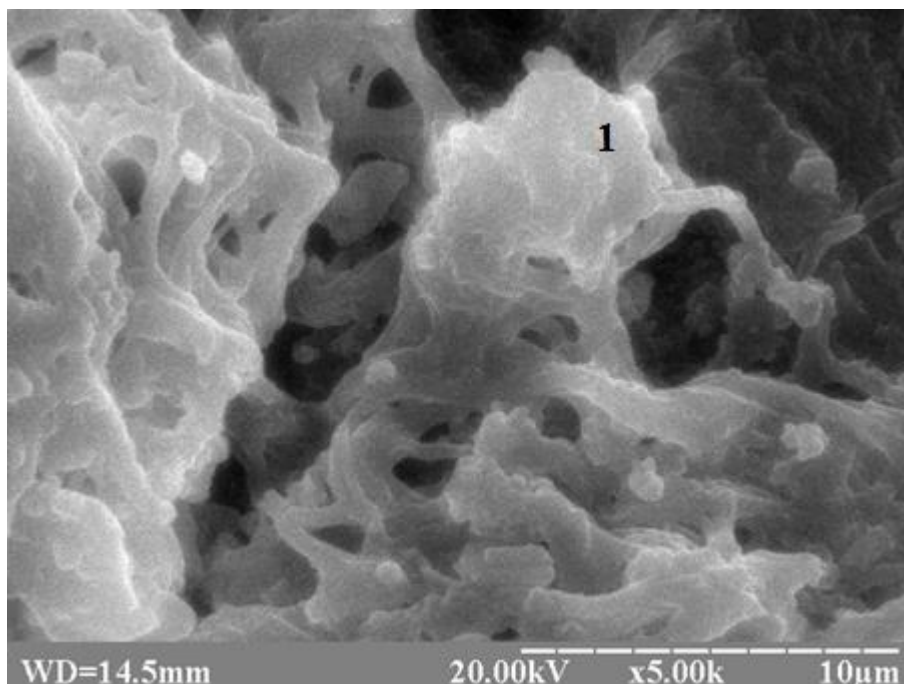


Рисунок 3.3.12 – Поверхня ділянки дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенеза. Остеобласт (1). Електронна сканограма

При морфометричному дослідженні ми встановили, що регенерат на 14-ту добу експерименту у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП складався із фіброретикулярної тканини площею $(68,94 \pm 1,61) \%$ та ретикулофіброзної кісткової тканини на $(31,06 \pm 1,61) \%$ (рис. 3.3.13 та табл. 3.4).



Рисунок 3.3.13 – Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 14-ту добу дослідження

Таблиця 3.4

Показники площ тканиноспецифічних структур регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 14 добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ + ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Площа запального інфільтрату, мм ²	-	0,15 ± 0,03	-	-	-	-	-
Площа грануляційної тканини, мм ²	-	0,18 ± 0,03	-	-	-	-	-
Площа фіброретикулярної тканини, мм ²	0,97 ± 0,03	1,29 ± 0,04	1,21 ± 0,03	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Площа ретикулофіброзної кісткової тканини, мм ²	0,78 ± 0,03	-	0,55 ± 0,03	-	-	0,722*	-
Площа хрящової тканини, мкм ²	-	0,14 ± 0,04	-	-	-	-	-

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні.

* – показник достовірної різниці між двома групами із використанням параметричного критерію Стьюдента (t)

На 21-шу добу вивчення репаративного остеогенезу у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП, спостерігалась подальша осифікація сформованих молодих трабекул. Але цей процес, як і у попередньому терміні дослідження мав локальний характер. У центральній ділянці дефекту утворення кісткових трабекул перебувало на початковій стадії. Відмічалось лише упорядкування фіброретикулярної тканини у пучки та вибудовування остеобластів вздовж них (рис. 3.3.14).

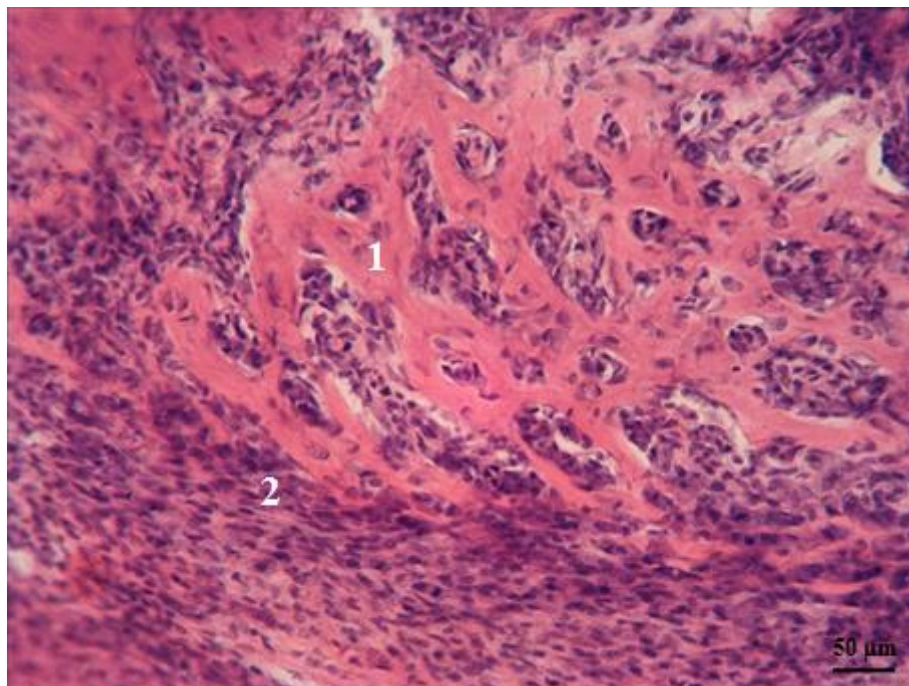


Рисунок 3.3.14 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Кісткові трабекули (1), фіброретикулярна тканина (2). Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

На 21-шу добу дослідження кісткового регенерата з використанням трансмісійного електронного мікроскопа у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП ми спостерігали велику кількість судини, просвіти, яких були заповненні еритроцитами, поодинокими нейтрофілами та лімфоцитами. У периваскулярному просторі виявлялися остеобласти в оточенні гетерогенного матрикса, який містив електроннощільні включення. Більша частина остеобластів

мала світлі ядра з одним або двома ядерцями. Зустрічалися й такі клітини, ядра яких мали малі розміри та містили грудки гетерохроматину під каріолемою (рис. 3.3.15).

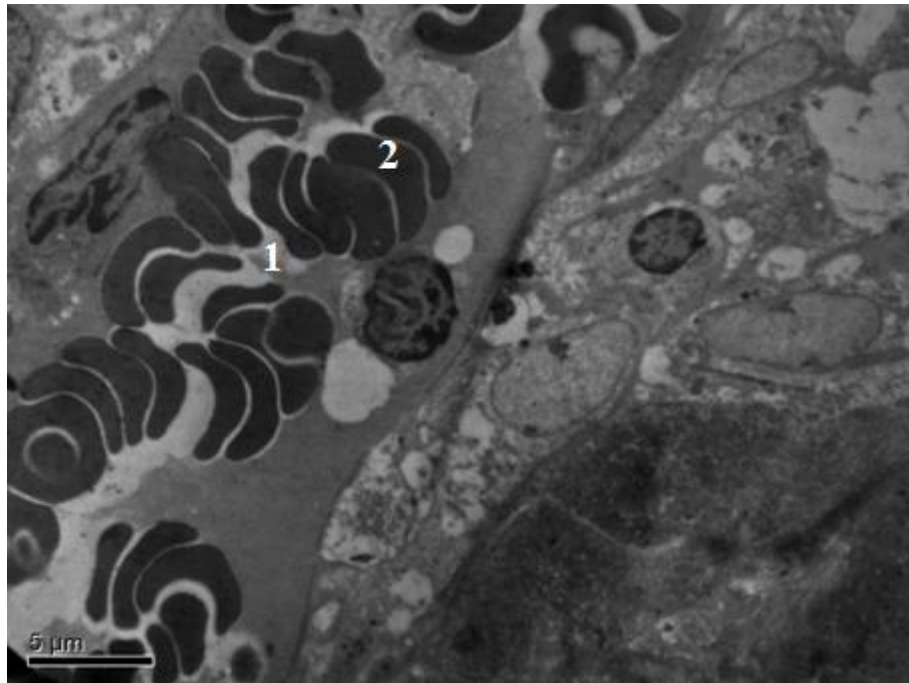


Рисунок 3.3.15 – Ультраструктура регенерата великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 21-шу добу репаративного остеогенеза. Просвіт судини (1), еритроцити (2). Контрастування ураніацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

При скануванні дефекту великогомілкової кістки у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 21-шу добу досліду центральна ділянка його поверхні була утворена масивними колагеновими тяжами. Біля материнської кістки спостерігались остеобласти занурені в остеїдний матрикс кісткових трабекул. Утворення нових кісткових балок простежувалося більше до центру дефекту по відношенню до попереднього терміну дослідження (рис. 3.3.16 – 3.3.17).

На 21-шу добу експерименту регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП складався із $(47,36 \pm 2,65)$ % фіброретикулярної тканини та $(52,64 \pm 2,64)$ % ретикулофіброзної кісткової тканини (рис. 3.3.18 та табл. 3.5).

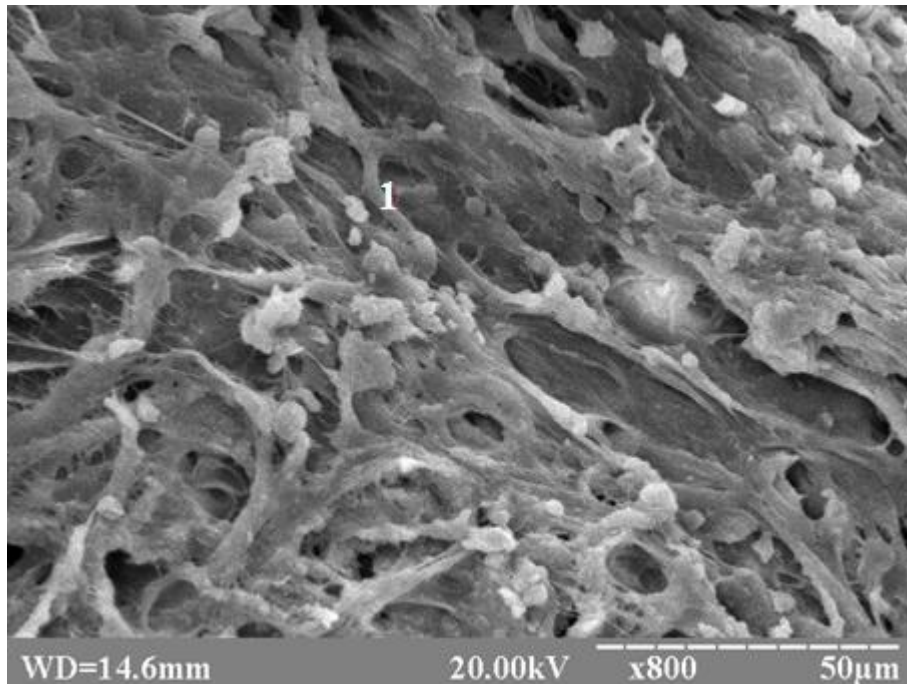


Рисунок 3.3.16 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Колагенові волокна (1). Електронна сканограма

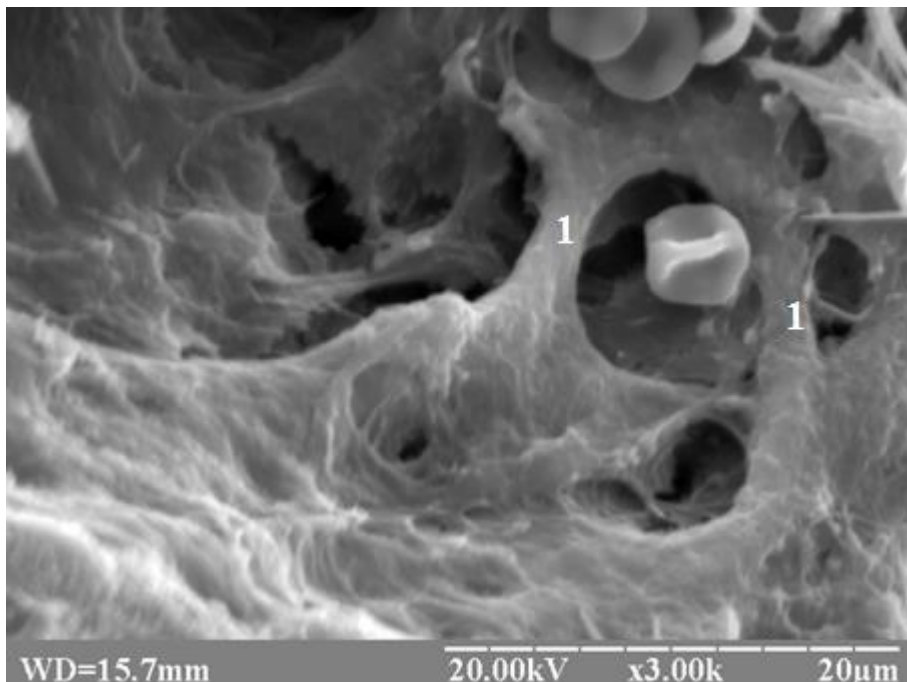


Рисунок 3.3.17 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Кісткові трабекули (1). Електронна сканограма

Таблиця 3.5

Показники площ тканиноспецифічних структур регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 21 добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ + ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Площа запального інфільтрату, мм ²	-	0,08 ± 0,01	-	-	-	-	-
Площа фіброретикулярної тканини, мм ²	0,74 ± 0,07	0,88 ± 0,01	0,83 ± 0,05	<0,001	<0,001	<0,001	0,011
Площа ретикулофіброзна і кісткової тканини, мм ²	1,01 ± 0,07	0,501 ± 0,02	0,92 ± 0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Площа хрящової тканини, мкм ²	-	0,303 ± 0,02	-	-	-	-	-

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

На 30-ту добу експерименту у тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП, більша половина дефекту великогомілкової кістки була заповнена ретикулофіброзною кістковою тканиною. Лише біля материнської кістки спостерігалися початкові вогнища формування пластинчастої кістки з відновленими остеонами з системою Гаверсових каналів, циліндричними пластинками та остеоцитами (рис. 3.3.19-3.3.20).

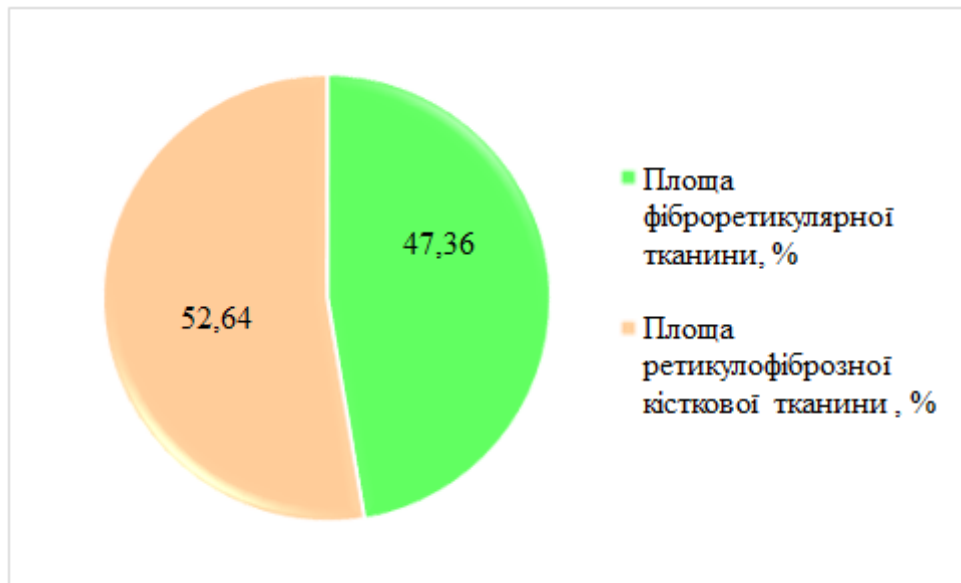


Рисунок 3.3.18 – Площі тканиноспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 21-шу добу дослідження

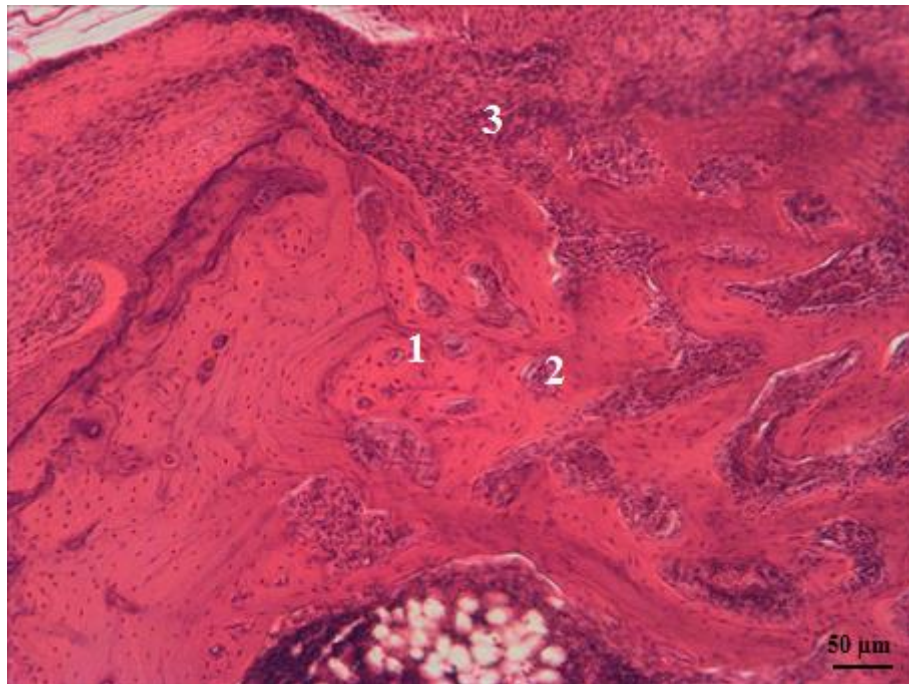


Рисунок 3.3.19 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 30-ту добу репаративного остеогенезу. Остеон (1), Гаверсовий канал (2), материнська кістка (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. 3б. х 100

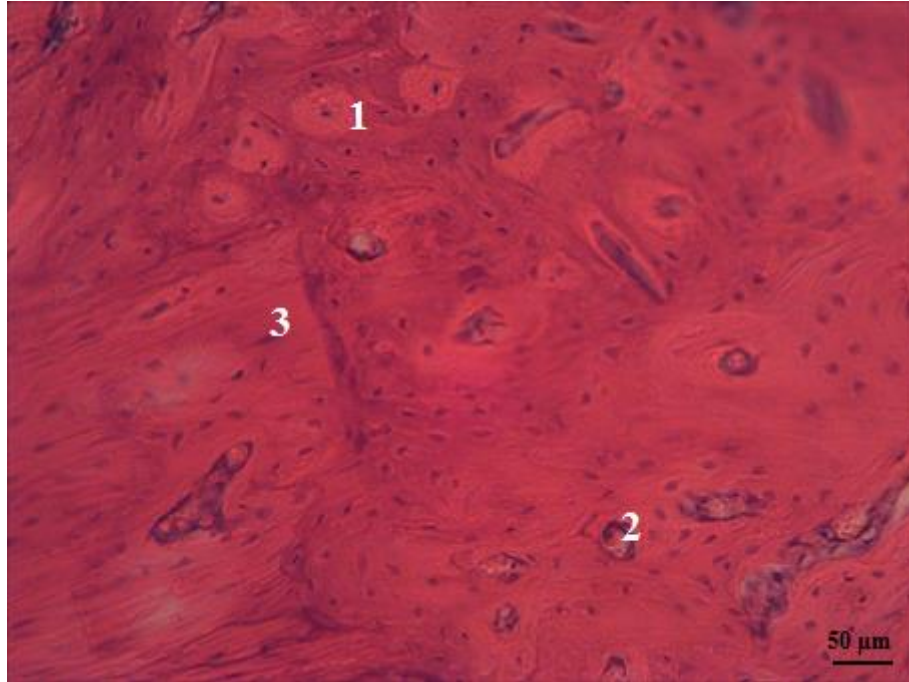


Рисунок 3.3.20 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 30-ту добу репаративного остеогенезу. Остеон (1), Гаверсовий канал (2), материнська кістка (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 100

Під час сканування дефекту центральна ділянка його поверхні була утворена масивними колагеновими тяжами. Біля материнської кістки спостерігались остеобласти, занурені в остеїдний матрикс кісткових трабекул. У центральній зоні заповнення дефекту відбулося за рахунок ретикулофіброзної кісткової та фіброретикулярної тканин. Формування окістя у даній групі на 30-ту добу лише починалось формуватись (рис. 3.3.21).

На 30-ту добу експерименту регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП складався із $(27,97 \pm 1,56)$ % фіброретикулярної тканини та $(72,03 \pm 1,56)$ % ретикулофіброзної кісткової тканини (рис. 3.3.22 та табл. 3.6).

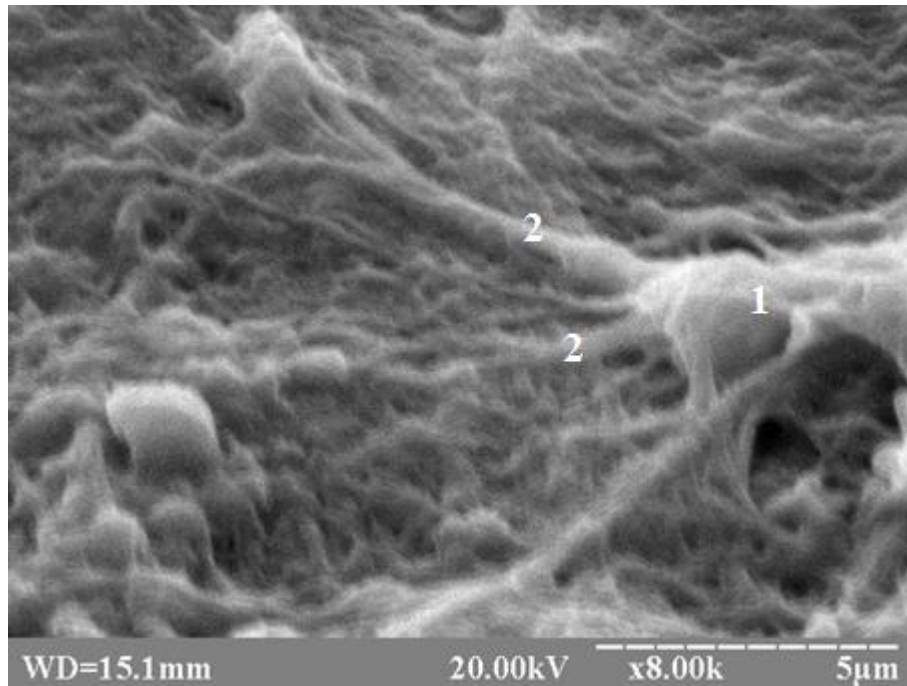


Рисунок 3.3.21 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Osteобласт (1), відростки остеобласта (2). Електронна сканограма



Рисунок 3.3.22 – Площі тканиноспецифічних структур регенерату у дефекті великогомілкової кістки щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 30-ту добу дослідження

Таблиця 3.6

Показники площ тканиноспецифічних структур регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 30 добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ + ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Площа фіброретикулярної тканини, мм ²	0,27 ± 0,02	0,496 ± 0,03	0,49 ± 0,03	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Площа ретикулофіброзної кісткової тканини, мм ²	1,48 ± 0,02	1,08 ± 0,04	1,26 ± 0,03	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Площа хрящової тканини, мкм ²	-	0,18 ± 0,06	-	-	-	-	-

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

Дослідження хімічного складу регенерата щурів із змодельованою ХГ, яким вводили ЗТП на 30-ту добу остеогенезу показало, що вміст натрію становило (1,92 ± 0,23) мг/г, калію – ((1,21 ± 0,12) мг/г, кальцію – (4,07 ± 0,43) мг/г, заліза – (33,43 ± 4,31) мкг/г, магнію – (1,98 ± 0,39) мг/г, цинку – (71,14 ± 5,78) мкг/г, міді – (0,29 ± 0,06) мкг/г (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Показники хімічних елементів регенерата щурів контрольної групи,
щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 30-тю добу дослідження

Показник	Контроль	ХГ	ХГ+ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Na (мг/г)	1,43 ± 0,14	2,59 ± 0,19	1,92 ± 0,23	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
K (мг/г)	1,29 ± 0,28	1,28 ± 0,13	1,21 ± 0,12	0,603	1,000	1,000	1,000
Ca (мг/г)	4,28 ± 0,29	3,51 ± 0,49	4,07 ± 0,43	0,001	0,001	0,788	0,017
Fe (мкг/г)	27,98 ± 1,18	35,47 ± 4,05	33,43 ± 4,31	<0,001	<0,001	0,005	0,604
Mg (мг/г)	2,11 ± 0,59	1,89 ± 0,28	1,98 ± 0,39	0,546	0,833	1,000	1,000
Zn (мкг/г)	61,03 ± 3,71	73,13 ± 7,51	71,14 ± 5,78	<0,001	<0,001	0,002	1,000
Cu (мкг/г)	0,21 ± 0,06	0,42 ± 0,08	0,29 ± 0,06	<0,001	<0,001	0,033	0,001

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

Отже, у щурів із ХГ, яким вводили ЗТП на ранніх стадіях репаративного остеогенезу відбувалось дещо уповільнення елімінації кісткового та запального детриту. Разом з тим, на 7-му добу збільшувалась кількість остеобластів та остеокластів, а грануляційна тканина реорганізовувалася у фіброретикулярну сполучнку тканину. Але все ж таки залишалися ознаки запалення. На 14-ту та 21-шу добу залишків кісткового детриту не відмічалось. Натомість відбулось різке розростання фіброретикулярної тканини та її упорядкування й формування у остеїдні балки. Біля материнської кістки тяжі сполучної тканини були дифузно звапнілими по поверхні яких розміщувалися щільним пластом остеобласти та поодинокі остеокласти. У центрі дефекту утворення кісткових трабекул не спостерігалось, але відмічалася велика кількість капілярів синусоїдного типу.

Загалом, репаративний остеогенез проходив по типу остеобластичного диферону. Хрящової тканини у регенераті на всіх термінах дослідження ми не виявили. Вміст натрію, кальцію, заліза та міді у регенераті на 3-тю добу остеогенезу у групі корекції зменшився на 37,47 % ($p < 0,001$), 22,21 % ($p = 0,115$), 33,66 % ($p < 0,001$) та 14,33 % ($p = 0,136$) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією, яким не вводили збагачену тромбоцитами плазму. На 30-ту добу концентрація натрію (на 25,98 % ($p < 0,001$)) та міді (на 29,74 % ($p = 0,001$)) була меншою у регенераті тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму порівняно зі щурами із хронічною гіперглікемією без корекції. Достовірної різниці у показниках вмісту калію, кальцію та магнію у регенератах щурів контрольної групи та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму виявлено не було. Концентрація заліза у регенераті тварин із групи корекції була більше на 19,48 % ($p = 0,005$) відповідно контрольного показника, однак достовірно не відрізнялася від групи щурів із хронічною гіперглікемією без застосування збагаченої тромбоцитами плазми.

Основні результати розділу опубліковані у працях [102, 107, 111].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проблема регенерації кістки після пошкодження має особливе значення у зв'язку з соціально-економічною актуальністю, яка пов'язана з необхідністю тривалого та високовартісного лікування та медичної реабілітації [209]. Цілісний аналіз остеогістогенеза після переломів та інших пошкоджень, пошук та обґрунтоване застосування засобів, які впливають на регенерацію кістки, можливі на підставі поглиблених знань загальних закономірностей остеогістогенеза, а також реактивних змін кісткової тканини у процесі регенерації [210-213]. Крім того, актуальність даного питання зростає з ростом супутньої патології такої, як ЦД, ожиріння та інші ендокринні порушення, хвороби нирок, захворювання серцево-судинної системи [2, 131].

Вважається, що тривалий вплив гіперглікемії призводить до зміни метаболізму кісток та порушення їх мікроструктури через різноманітні механізми на молекулярному та структурному рівнях. Зокрема, відомо, що ЦД пригнічує процеси ремоделювання кісток [9], зумовлює накопичення в них кінцевих продуктів глікації [10], спотворює реакцію на гормональні сигнали та викликає розвиток мікросудинних ускладнень [11].

Сьогодні особливу увагу вчених привертає питання післятравматичного відновлення кісток в умовах ХГ. Результати багатьох досліджень на тваринах показали, що ЦД пов'язаний із порушенням процесу остеорегенерації [119, 214, 215], що проявляє себе пригніченням проліферації клітин та зменшення механічної жорсткості в ділянці перелому.

Експерименти *in vitro* встановили, що ХГ гальмує дозрівання остеобластів та призводить до зсуву диференціації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) від остеобластогенезу в бік адипогенезу [216]. Поряд із цим виявлено, що у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом

суттєво зменшується експресія факторів транскрипції, необхідних для остеобластної диференціації МСК [217].

Останніми роками аутологічні концентрати тромбоцитів широко використовують для регенерації тканин у клінічній практиці [179]. Вже доведено високу ефективність біологічних препаратів на основі збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) у лікуванні спортивних травм, при операціях на суглобах та кістках, в стоматології [218, 219]. Однак відомостей про ефективність та можливість застосування ЗТП при переломах довгих трубчастих кісток в осіб, які страждають на хронічну гіперглікемію або ЦД II типу, у світовій науковій літературі недостатньо.

Отже, незадовільні наслідки порушень регенерації кісток в осіб, які страждають на ЦД, їх велика поширеність та кількість ускладнень, труднощі під час лікування вимагають подальшого дослідження та більш глибокого розуміння процесів репаративного остеогенезу за умов ХГ та нових ефективних, економічно більш доступних підходів до їх лікування.

Не дивлячись на значну кількість робіт щодо розкриття особливостей молекулярних та клітинних механізмів регенерації кісток в осіб із ЦД, на сьогодні бракує сучасних морфологічних досліджень, які б дозволили на різних рівнях структурної організації охарактеризувати посттравматичне відновлення кісток в умовах впливу на організм ХГ та при застосуванні ЗТП, що і стало метою нашого дослідження.

У представленому дослідженні проведено вивчення морфологічних особливостей регенерації довгих кісток скелета у щурів без порушення вуглеводного обміну та тварин із ХГ, а також були вивчені особливості репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП. Для експерименту була обрана механічна травма великогомілкової кістки. ХГ моделювали за допомогою двотижневого навантаження фруктозою та одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину і нікотинової кислоти.

Вивчення морфологічних особливостей остеогенезу у всіх щурів проводили на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після моделювання дефекту великогомілкової кістки, хіміко-аналітичний аналіз проводили на 3-тю та 30-ту добу остеорепарації.

Так, під час аналізу ранніх стадій процесу остеогенезу ми виявили затримання ліквідації першої фази запалення у тварин із хронічною гіперглікемією, як наслідок, на 7-му добу більша частина дефекту залишалася заповненою некротичним кістковим детритом, фібрином, нейтрофільними гранулоцитами та жирною тканиною. На 7-му добу репаративного остеогенезу в щурів контрольної групи площа запального інфільтрату та грануляційної тканини в регенераті була меншою на 93,39 % ($p < 0,001$) та 13,11 % ($p < 0,001$) відповідно тварин із ХГ. Площа фіброретикулярної тканини була меншою у щурів із ХГ на 82,49 % ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою (рис. 4.1).

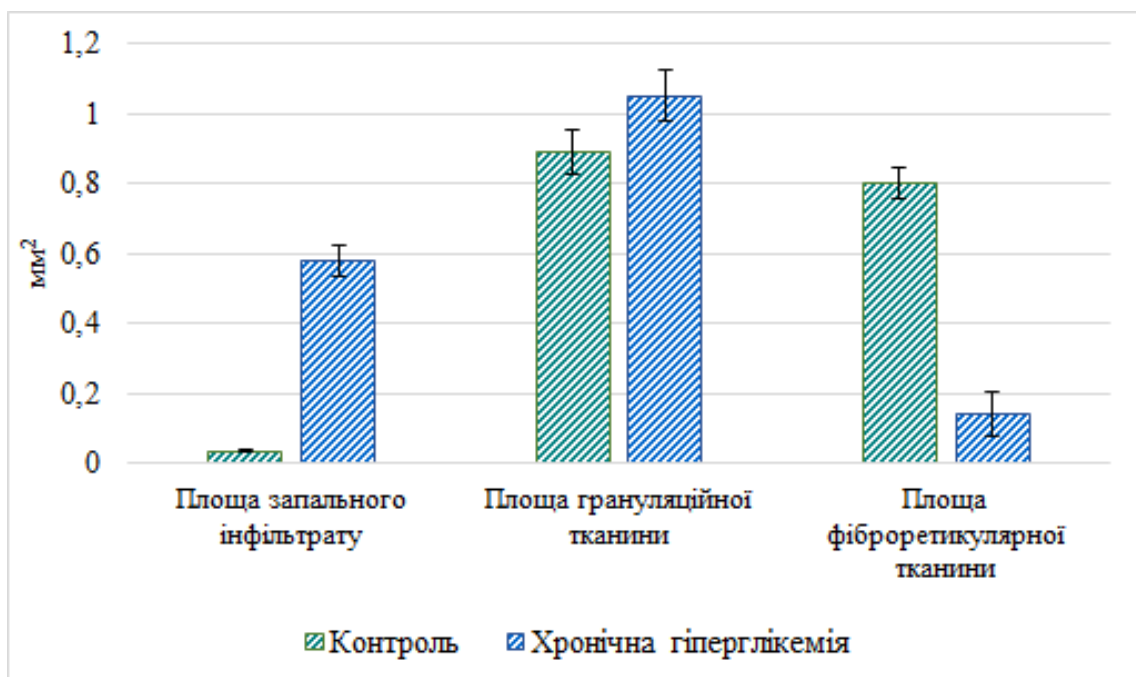


Рисунок 4.1 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи та із хронічною гіперглікемією на 7-му добу експерименту

На думку Carlos Marin та співавторів, при хронічній гіперглікемії порушується узгоджена дія сигнальних молекул та регуляторів транскрипції репаративного остеогенезу, що призводить до зниження функціонування остеобластів, збільшення кількості жирової тканини у складі регенерату та істотного гальмування процесу консолідації переломів [123].

У тварин із хронічною гіперглікемією репаративний остеогенез є тривалішим за часом, ніж у тварин із нормальними показниками глюкози в крові. На фоні ХГ порушуються нео- та ангиогенез, посилюються механізми запалення, що перешкоджають правильному розподілу остеогенних клітин, кисню та поживних речовин у зоні регенерації. Спостерігається порушення катаболізму тканинних структур та проліферації клітинних елементів, які диференціюються в бік адипогенної лінії, збільшуючи вміст жирової тканини в мозолі перелому, а це призводить до процесів гальмування консолідації відламків кісток [123, 143].

У нашому дослідженні морфологічна картина репаративного остеогенезу на ранніх стадіях процесу в щурів контрольної групи та із хронічною гіперглікемією відповідала результатам досліджень низки вітчизняних і закордонних учених [8, 9].

При подальшому аналізі стадій процесу остеорепарації ми, також виявили затримання ліквідації першої фази запалення у тварин із ХГ, як наслідок, на 14-ту добу регенерат у цій групі містив жирові клітини, ділянки локальної грануляційної тканини з лімфоцитарно-лейкоцитарною інфільтрацією. Крім того, ми виявили, що в групі тварин із хронічною гіперглікемією відбувається порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату.

A. Sadighi, M. L. Brown та співавтори повідомляють про високий відсоток (від 8 до 32 %) порушень процесів репаративного остеогенезу в умовах ЦД 2-го типу, а також про те, що гіперглікемія призводить до зменшення проліферації та диференціації клітин хрящового й остеобластичного диферонів, які беруть участь у регенерації [37, 50, 74, 118].

Важливу роль у загоєнні кістки при ЦД відіграє інсулін, що стимулює утворення кісткового матриксу, призводить до збільшення синтезу колагену остеобластами. У дослідженнях *in vitro* було визначено зниження рівня осифікації новоутвореної тканини та порушення формування хряща в умовах дефіциту інсуліну. Дослідники з'ясували, що в щурів із ЦД рівень синтезу колагену в зоні перелому знижувався на 50-55 %, що призводило до погіршення механічних властивостей новоутвореної тканини [121]. У нашому дослідженні, ми виявили порушення структурування колагену в остеїдні балки у тварин із ХГ та нерівномірне утворення й розміщення хрящової тканини в регенераті.

Н. В. Дєдх та О. О. Сикал в експериментальних дослідженнях з'ясували, що на фоні змодельованого ЦД у тварин у ділянці регенерату відзначалася підвищена щільність остеокластів, зросла площа хондроїда та відбулося порушення заміщення хрящової тканини кістковою, порушувалися процеси ангиогенезу, утворення колагену та глікозаміногліканів. Площа фіброретикулярної тканини в ділянці регенерату у тварин із ЦД значно перевищувала показник у контрольних тварин, що свідчило про ускладнення процесів репаративного остеогенезу [129].

Аналіз морфометричних показників у нашому дослідженні виявив, що у тварин, в яких рівень глюкози перевищував нормальні показники, на 14-ту добу репаративного остеогенезу площа фіброретикулярної тканини у регенераті була більшою на 32,91 % ($p < 0,001$) відповідно тварин контрольної групи. Формування ретикулофіброзної кісткової тканини на цьому терміні дослідження в цій групі не відбулося (рис. 4.2).

На 21-шу добу процесу остеорепарації площа фіброретикулярної тканини у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією була більшою на 41,79 % ($p < 0,001$), а ретикулофіброзної кісткової тканини меншою на 50,72 % ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи. Крім цього, кістковий регенерат тварин із ХГ містив ($17,19 \pm 1,3$) % хрящової тканини, що на 115,55 % ($p < 0,001$) більше ніж у попередньому терміні дослідження. Повного розсмоктування запального інфільтрату ми не спостерігали. Але, його площа зменшилася на 46,02 % ($p < 0,001$) відповідно попереднього показника (рис. 4.3).

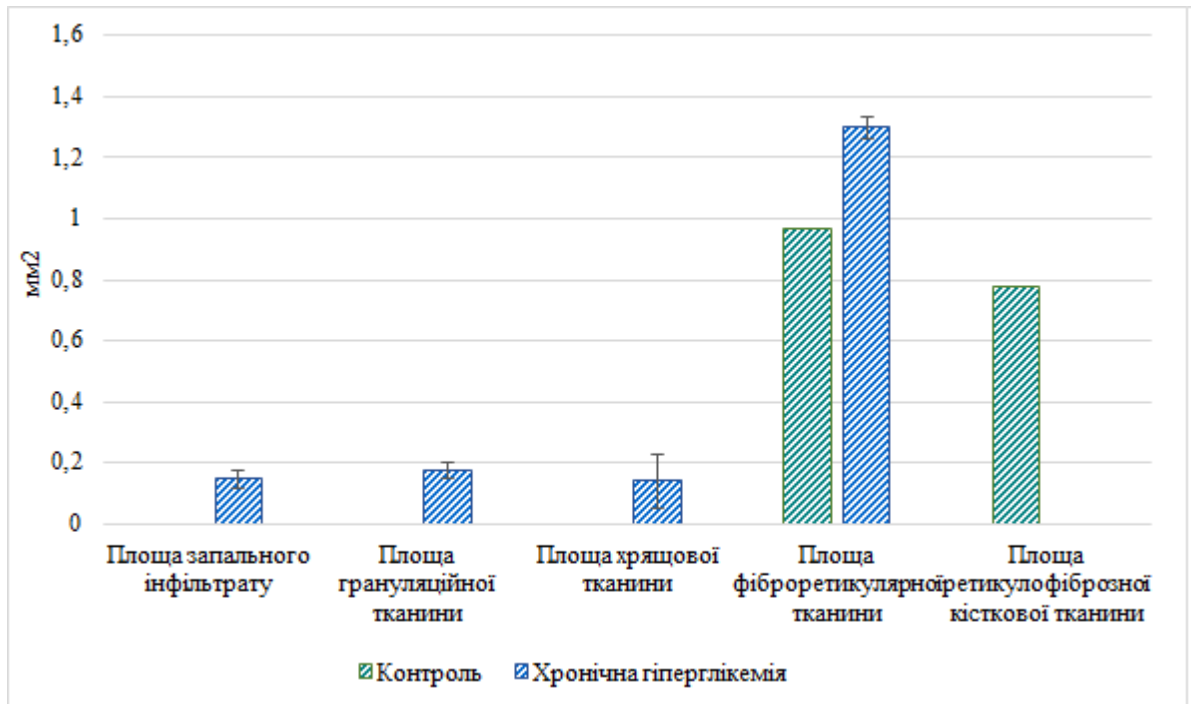


Рисунок 4.2 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи та із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу експерименту

На 30-ту добу процесу остеорепарації у регенераті щурів із ХГ площа новоутвореної ретикулофіброзної кісткової тканини була на 26,94 % ($p < 0,001$) менше від контрольного показника. У тварин контрольної групи відбулось ремоделювання більшої частини ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту з повноцінними остеонами зі сформованими Гаверсовими каналами.

Таким чином, наше дослідження підтверджує, що у тварин із хронічною гіперглікемією процес репаративного остеогенезу більш тривалий, що обумовлюється затриманням переходу від однієї стадії до іншої.

Підходи до лікування пошкоджень опорно-рухового апарату за останні роки значно змінилися. Відповідно до уявлень більшості сучасних авторів застосування ЗТП – це простий, доступний і мінімально інвазивний спосіб отримання природної концентрації аутологічних медіаторів, таких як: інсуліноподібний фактор росту-1; основний фактор росту фібробластів; тромбоцитарний, епідермальний та ендотеліальний фактори росту;

трансформуючий фактор росту бета, що відіграють найважливішу роль в ослабленні запальної реакції, елімінації некротизованих клітин і мають низку потенційних переваг перед існуючими способами. Доступність, простота, ефективність методу, відсутність алергічних реакцій відкривають перспективи його подальшого дослідження та більш широкого використання в клінічній медицині [154, 159, 180, 219, 220].

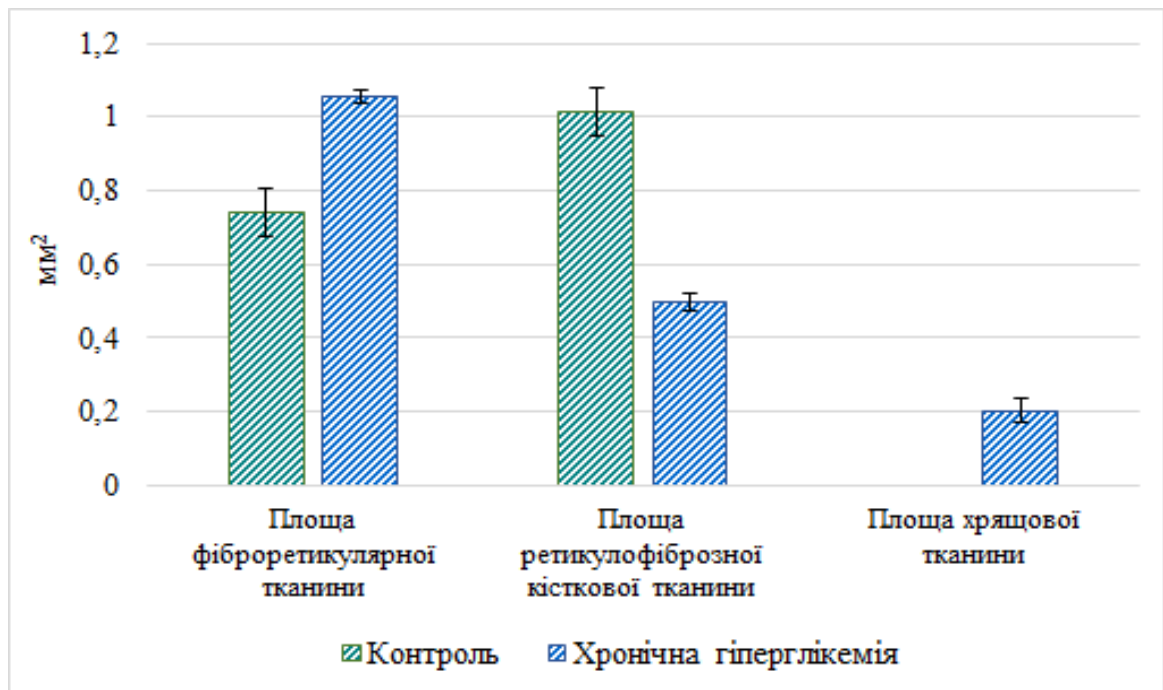


Рисунок 4.3 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи та із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу експерименту

За даними О. А. Бур'янова та співавторів, при використанні аутогенної кісткової тканини та фібрину, збагаченого тромбоцитами, в регенераті відзначалося хаотичне розміщення кісткових трабекул та їх різна зрілість, нерівномірна щільність остеоцитів на поверхні кісткових трабекул, формування періосту, який складався з колагенових волокон пухкої та щільної консистенції. Кісткова тканина, що є регенератом, мала певні відмінності від материнської: високу щільність остеоцитів, які мали базофільні ядра з цитоплазмою невеликого об'єму. Ці клітини були розміщені в лакунах, що свідчило про відсутність остеоцитарного остеолізу [181].

У нашому дослідженні ми виявили, що у щурів із ХГ, яким вводили ЗТП на 3-тю добу експерименту площа запального інфільтрату у регенераті була менше на 4,81 % ($p < 0,001$), а площа грануляційної тканини була більше на 20,63 % ($p < 0,001$) ніж у групі щурів із ХГ (рис. 4.4).

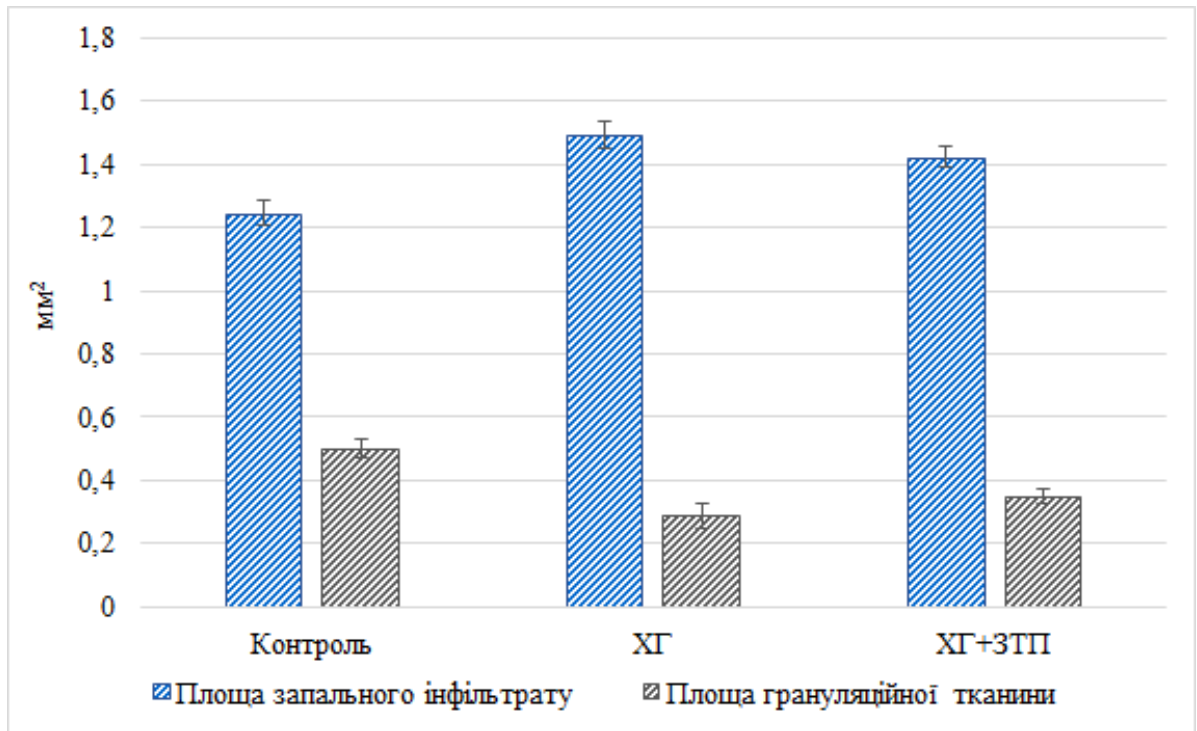


Рисунок 4.4 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи, із хронічною гіперглікемією та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 3-тю добу експерименту

На 7-му добу остеорепації площа запального інфільтрату у щурів із ХГ, яким застосовували ЗТП вже була меншою на 71,79 % ($p < 0,001$) порівняно з тваринами, яким не вводили ЗТП. Площа грануляційної тканини зменшилась на 25,41 % ($p < 0,001$) у тварин із ЗТП відповідно щурів із ХГ. При цьому фіброретикулярної тканини було менше у тварин із ХГ на 81,99 % ($p < 0,001$) порівняно із тваринами, яким вводили ЗТП (рис. 4.5). Але всі показники не досягли рівня контрольних значень.

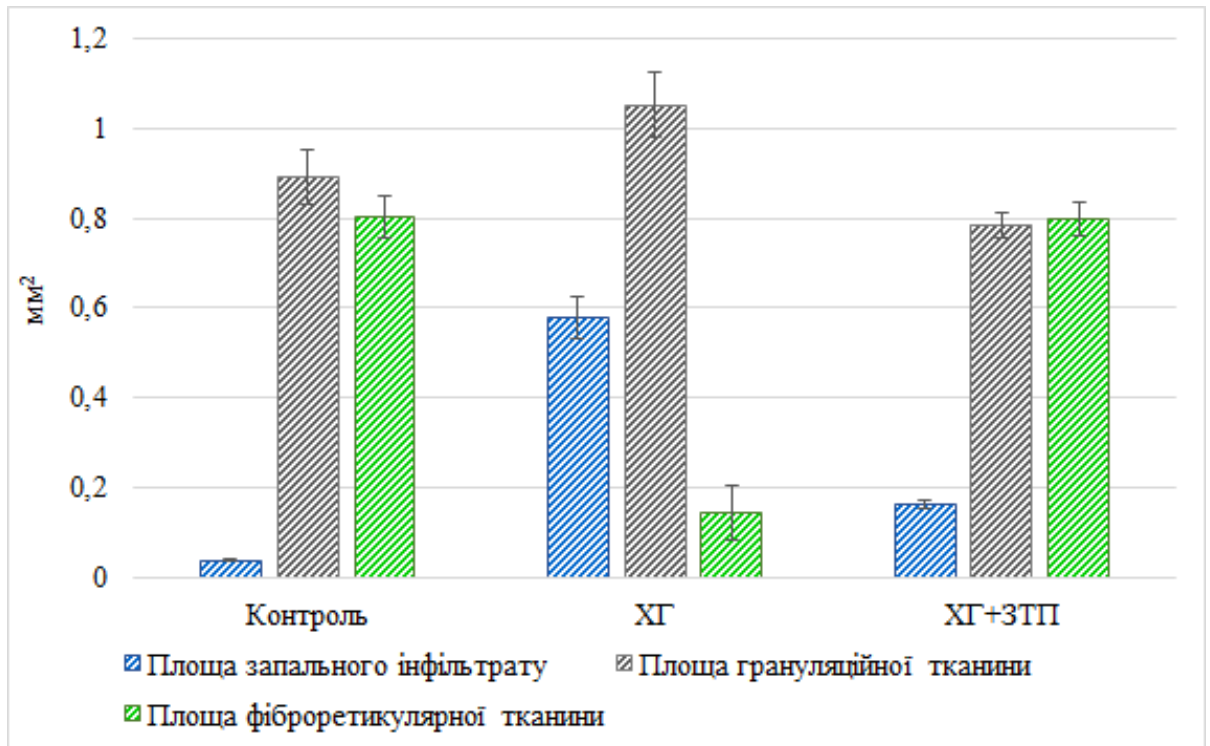


Рисунок 4.5 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи, із хронічною гіперглікемією та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 7-му добу експерименту

У групі тварин із ХГ організму, яким після завдання дефекту великогомілкової кістки вводили в рану ЗТП, на 14-ту добу остеогенезу, на відміну від тварин із ХГ, запального інфільтрату, грануляційної та хрящової тканини в регенераті ми не виявили. Разом з тим, він складався із фіброретикулярної тканини, площа якої була меншою на 6,53 % ($p < 0,001$) від тварин із ХГ, яким не вводили ЗТП, та $(0,55 \pm 0,03)$ мм² ретикулофіброзної кісткової тканини, якої у тварин із ХГ ми не виявили на цьому терміні дослідження (рис. 4.6).

Крім того, у тварин, яким вводили ЗТП вже на 14-ту добу експерименту ми спостерігали упорядкування й трансформацію фіброретикулярної тканини в остеїдні трабекули. Найінтенсивніше цей процес відбувався біля материнської кістки. У центрі дефекту ми спостерігали велику кількість капілярів синусоїдного типу у товщі фіброретикулярної тканини.

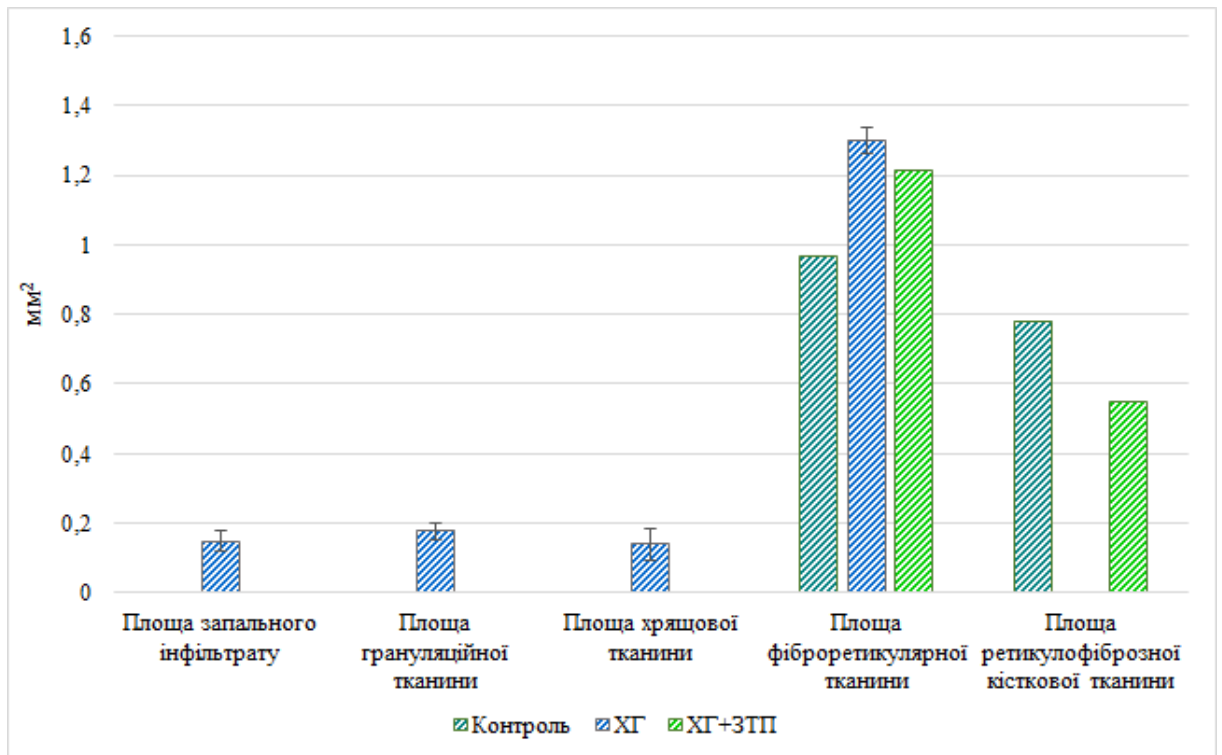


Рисунок 4.6 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи, із хронічною гіперглікемією та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 14-ту добу експерименту

Одержані вищезазначені дані свідчать про ще одну дуже важливу здатність ЗТП – антимікробну активність, що також показано й у дослідженнях Т. М. Bielecki і співавт. [221], які аналізували антибактеріальний ефект *in vitro*, збагаченої тромбоцитами плазми. У результаті виявили пригнічення росту *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* та одночасне індукування росту *Ps. aeruginosa*, що свідчить про різну стійкість мікроорганізмів до плазми, збагаченої тромбоцитами. Автори вважають, що комбінація індуктивних та антимікробних властивостей збагаченої тромбоцитами плазми може покращувати результати лікування хворих з інфікованими переломами і несправжніми суглобами. У нашому дослідженні на 14-ту добу репаративного остеогенезу при застосуванні ЗТП ми спостерігали повне очищення рани від залишків запального інфільтрату, яке не відбулось у тварин без застосування ЗТП.

На 21-шу та 30-ту добу у щурів із ХГ, яким вводили ЗТП кількість ретикулофіброзної кісткової тканини у регенераті збільшилася. Так, на 30-ту добу експерименту її площа була більшою на 16,89 % ($p < 0,001$) ніж у тварин із ХГ, але на 14,59 % ($p < 0,001$) менше порівняно із тваринами контрольної групи (рис. 4.7). Хрящової тканини у регенераті щурів, яким вводили ЗТП ми не виявили. Крім того, ми спостерігали велику кількість судини із повнокровними просвітами.

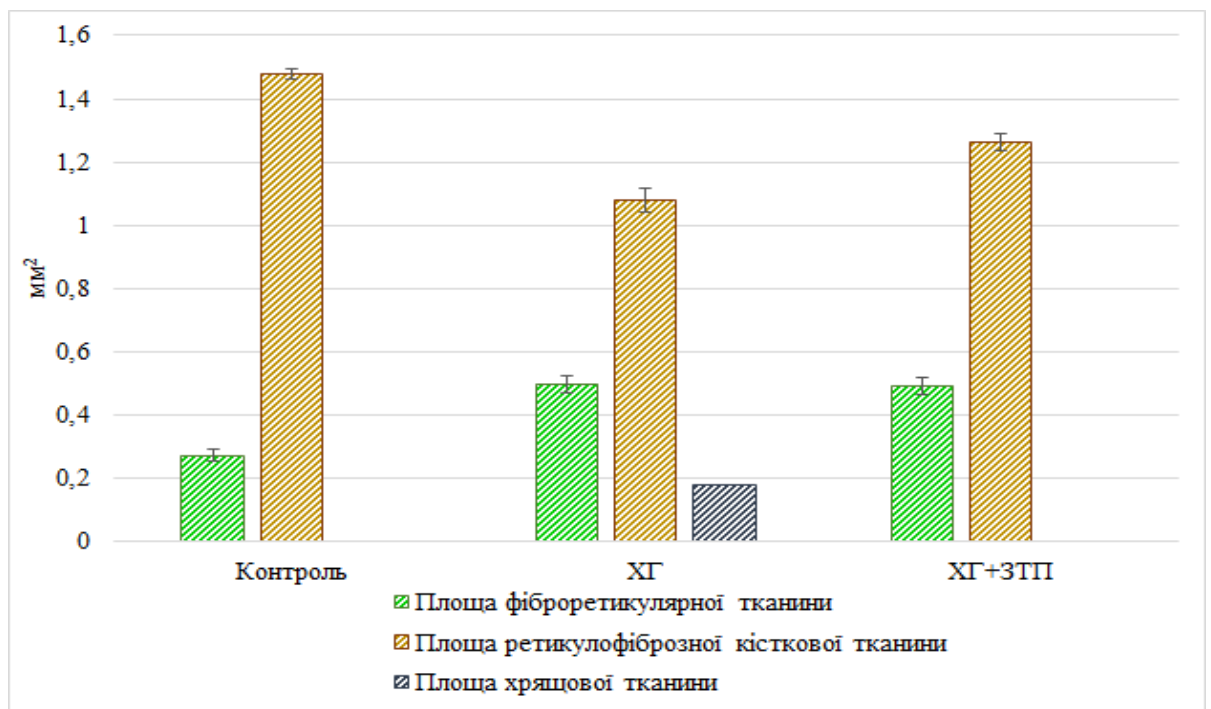


Рисунок 4.7 – Площі тканиноспецифічних структур регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи, із хронічною гіперглікемією та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 30-ту добу експерименту

Також, тваринам, яким вводили ЗТП, дефект великогомілкової кістки був заповнений упорядкованою грубоволокнистою кістковою тканиною, а біля материнської кістки – пластинчастою кісткою з повноцінними остеонами. У групі щурів із ХГ, яким не вводили ЗТП, відбулось формування лише ретикулофіброзної кісткової тканини. Біля материнської кістки остеогенні трабекули були структуровані, а у центральній частині дефекту вони мали

нерівномірну товщину й дезорганізоване розміщення. Спостерігалось локальне заміщення дефекту хрящовою тканиною в оточенні фіброретикулярної тканини. Формування зрілої пластинчастої кістки в цій групі спостереження ми не виявили.

Одержані дані в нашому дослідженні підтверджують, що при введенні ЗТП зменшуються набряк у пошкоджених тканинах, ознаки гострого запалення, фаза альтерації швидше змінюється регенераторно-репаративними процесами [203].

Провівши детальний статистичний аналіз показників хімічних елементів кісткових регенератів, ми виявили, що на початку дослідження остеогенезу між усіма групами була достовірна різниця по всім елементам. При цьому, концентрація міді між групами ХГ та ХГ+ЗТП не мала статистичної значимості ($p = 0,136$). Вміст Na, Fe, Ca та Zn був більшим у групі із змодельованою хронічною гіперглікемією порівняно з контролем, що може бути внаслідок затримки ліквідації запалення у місці кісткового дефекту. У групі щурів із змодельованою хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП концентрації Na, Fe та Zn були нижчими ніж у групі тварин із ХГ, але більшими ніж у контрольній групі. Вміст K, та Mg у групі з корекцією був вищим ніж у групі із ХГ, але меншим порівняно з контролем. Концентрація Cu у групі ХГ+ЗТП була більшою на 95,64 % ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи (табл. 4.1)

У дослідженні Devi T. R. та авторів було показано, що у людей, які страждали на ЦД 2 типу з ускладненнями концентрація Zn у сироватці крові була достовірно менше ніж у групі людей, які не мали ускладнення та контрольній групі. Рівень Cu у сироватці крові пацієнтів із ЦД 2 типу був вищий ніж у здорових людей та пацієнтів, які страждали на ЦД 2 типу з ускладненнями. Автори вважають, що змінені рівні мікроелементів Zn та Cu є важливими сприятливими факторами для розвитку ускладнень у людей, які страждають на ЦД 2 типу [222].

Аналогічні результати спостерігалися у дослідженнях Di-Silvestro RA та ін. та Zagar A. H. та ін. [223-226]. Підвищення рівня іонів Cu у пацієнтів з ЦД може бути пов'язано з гіперглікемією, яка може стимулювати глікування та вивільнення іонів міді, і це прискорює окислювальний стрес, який бере участь у патогенезі діабету. Дослідження довели, що мідь викликає окислювальний стрес. Велика частина міді в плазмі транспортується пов'язаною з церулоплазміном ($> 95\%$); інше

пов'язане з альбуміном та іншими білками, які утворюють комплекси з мідю. Церулоплазмін є реагентом гострої фази, володіє феро- O_2 оксидоредуктажною (прооксидантною) активністю, спрямованою на стимульоване іонами двовалентного заліза перекисне окислення ліпідів. Є деякі свідчення того, що ХГ може пошкодити Cu-зв'язуючі властивості обох білків. Мідь токсична у своїй незв'язаній формі, викликає окислювально-відновний дисбаланс через її високу окислювально-відновно активну природу. Мідь має здатність зв'язуватися з білками, які були глікірованими. Існує антагоністичний взаємозв'язок між рівнями Cu та Zn при діабеті [223-228].

Таблиця 4.1

Показники хімічних елементів регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 3-тю добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ+ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Na (мг/г)	1,81 ± 0,05	3,91 ± 0,37	2,45 ± 0,39	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
K (мг/г)	1,92 ± 0,12	0,73 ± 0,11	1,18 ± 0,08	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ca (мг/г)	2,12 ± 0,29	3,11 ± 0,61	2,42 ± 1,03	0,013	0,013	1,000	0,115
Fe (мкг/г)	39,31±1,35	76,15±8,74	50,52 ± 7,49	<0,001	<0,001	0,003	<0,001
Mg (мг/г)	2,63 ± 0,59	1,35 ± 0,36	1,49 ± 0,33	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Zn (мкг/г)	81,34±2,69	132,58±5,66	128,12±17,73	<0,001	<0,001	<0,001	1,000
Cu (мкг/г)	0,28 ± 0,08	0,63 ± 0,12	0,54 ± 0,08	<0,001	<0,001	<0,001	0,136

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

На 30-ту добу дослідження концентрації Na, Fe, Zn та Cu у кістковому регенераті достовірно відрізнялися між групами порівняння. Найбільший вміст цих елементів був у тварин із хронічною гіперглікемією. У щурів із ХГ, яким вводили ЗТП концентрація Na, Fe, Zn та Cu знизилася, але до показників контрольної групи не досягла. Дані зміни можуть бути пов'язані, із пролонгуванням фази запалення на початку остеогенезу та розвитком хрящової тканини. Достовірної різниці між концентраціями K та Mg між групами порівняння ми не виявили. Вміст Ca між групами порівняння статистично відрізнявся, але за даними подальшого апостеріорного тесту Бонферроні достовірної різниці у його показниках не було між контрольною групою та тваринами із ХГ, яким вводили ЗТП (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Показники хімічних елементів регенерата щурів контрольної групи, щурів із ХГ та щурів ХГ+ЗТП на 30-ту добу експерименту

Показник	Контроль	ХГ	ХГ+ЗТП	P_1	P_2	P_3	P_4
Na (мг/г)	1,43 ± 0,14	2,59 ± 0,19	1,92 ± 0,23	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
K (мг/г)	1,29 ± 0,28	1,28 ± 0,13	1,21 ± 0,12	0,603	1,000	1,000	1,000
Ca (мг/г)	4,28 ± 0,29	3,51 ± 0,49	4,07 ± 0,43	0,001	0,001	0,788	0,017
Fe (мкг/г)	27,98±1,18	35,47±4,05	33,43 ± 4,31	<0,001	<0,001	0,005	0,604
Mg (мг/г)	2,11 ± 0,59	1,89 ± 0,28	1,98 ± 0,38	0,546	0,833	1,000	1,000
Zn (мкг/г)	61,03±3,71	73,13±7,51	71,14±5,78	<0,001	<0,001	0,002	1,000
Cu (мкг/г)	0,21 ± 0,06	0,42 ± 0,08	0,29 ± 0,06	<0,001	<0,001	0,033	0,001

P_1 – показник статистичної достовірності при одночасному порівнянні між собою контрольної групи, щурів із ХГ та групи ХГ+ЗТП методом ANOVA;

P_2 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ методом Бонферроні;

P_3 – показник статистичної достовірності при порівнянні контрольної групи із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні;

P_4 – показник статистичної достовірності при порівнянні групи ХГ із групою ХГ+ЗТП методом Бонферроні

Отже, одержані результати показують, що за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм відбувається затримання ліквідації першої фази запалення у ділянці кісткового дефекту, що подовжує процес репаративного остеогенезу. Порушується проліферація та диференціація клітин остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми коригує негативний вплив хронічної гіперглікемії на репаративний остеогенез, сприяє більш швидкому видаленню запального інфільтрату з місця дефекту кістки, формуванню остеогенного диферону та ремоделюванню грубоволокнистої кісткової тканини у повноцінну пластинчасту кістку, нормалізації макро- та мікроелементного складу регенерату.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подане теоретичне узагальнення та вирішення наукового завдання, що полягає у визначенні морфологічних особливостей остеогенезу щурів за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Вивчена можливість коригувальної дії збагаченої тромбоцитами плазми на процес репаративного остеогенезу в умовах впливу хронічної гіперглікемії.

1. Репаративний остеогенез у контрольних щурів характеризувався низкою послідовних стадій. На ранніх етапах процесу у регенераті відмічалися запальні зміни, формування посттравматичної гематоми, але вже на 14-ту добу дослідження їх не було виявлено. На 30-ту добу репаративного остеогенезу відбувалось інтенсивне ремоделювання ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту. Морфометричним аналізом було встановлено, що у кінці експерименту регенерат був утворений ретикулофіброзною та пластинчастою кістковою тканиною, площа яких склала $(84,44 \pm 1,03) \%$ від усієї зони остеорепарації. Для регенерату було характерне зменшення концентрації калію, натрію, заліза, магнію, цинку та міді, а для кальцію, навпаки, зростання вмісту в кінці експерименту, що пов'язано з утворенням морфологічно зрілої кісткової тканини.

2. Досліджено, що на ранніх стадіях репаративного остеогенезу хронічна гіперглікемія призводить до послаблення процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату, затримання розвитку грануляційної тканини. Затримка ліквідації запалення у місці кісткового дефекту призводить до зростання вмісту фіброретикулярної тканини та робить процес репаративного остеогенезу більш тривалішим. На пізніх стадіях остеорепарації у тварин із хронічною гіперглікемією відзначалося порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату, внаслідок чого формування зрілої пластинчастої кістки у кінці експерименту не відбулося.

3. Морфометричним аналізом було виявлено, що кістковий регенерат на 21-шу добу у щурів із хронічною гіперглікемією ще містив ($4,52 \pm 0,67$) % запального інфільтрату, що підтверджує уповільнення процесу остеорепарації. Лише на 30-ту добу ознак запалення у регенераті не було виявлено за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм. Окрім затримки регресії запального інфільтрату, на 21-шу добу остеорепарації у кістковому регенераті тварин із хронічною гіперглікемією продовжувалася збільшуватися площа хрящової тканини (на 115,55 % ($p < 0,001$)) порівняно з попереднім терміном дослідження, але на 30-ту добу відбулося зменшення її площі, але лише на 40,66 % ($p < 0,001$) порівняно із 21-ою добою. У кінці експерименту площа ретикулофіброзної кісткової тканини у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією була меншою на 50,72 % ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи. Отже дані зміни підтверджують негативний вплив хронічної гіперглікемії на формування повноцінної кісткової тканини в ділянці дефекту.

4. На початку остеогенезу за умов впливу хронічної гіперглікемії, у регенераті спостерігалось збільшення концентрації натрію на 115,78 % ($p < 0,001$), кальцію – на 46,42 % ($p = 0,013$), заліза – на 93,71 % ($p < 0,001$), цинку – на 62,99 % ($p < 0,001$) та міді – на 128,36 % ($p < 0,001$) внаслідок уповільнення регресії гематоми та утилізації кісткового детриту. У кінці експерименту спостерігалось зменшення концентрацій зазначених елементів, однак рівня контрольних показників вони не досягли. Вміст кальцію був менше на 17,92 % ($p = 0,001$) відповідно контрольної групи, що свідчить про зниження мінералізації утвореного регенерату.

5. Встановлено, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми у щурів із хронічною гіперглікемією на ранніх стадіях репаративного остеогенезу, не призводить до значного пришвидшення елімінації кісткового та запального детриту. Разом з тим, відбувалось збільшення остеобластів та остеокластів, а грануляційна тканина реорганізовувалася у фіброретикулярну сполучну тканину. На 14-ту добу залишків кісткового детриту не було виявлено. Відбулось різке розростання фіброретикулярної тканини та її

упорядкування й формування у остеїдні трабекули. Хрящової тканини у регенераті на всіх термінах дослідження виявлено не було. Репаративний остеогенез проходив по типу остеобластичного диферону. Формування пластинчастої кістки з повноцінними остеонами було виявлено біля материнської кістки у кінці експерименту, в центрі регенерат складався з упорядкованої грубоволокнистої кісткової тканини.

6. Встановлено, що регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією, яким у дефект вводили збагачену тромбоцитами плазму, у кінці експерименту складався із ретикулофіброзної кісткової тканини, площа якої була більшою на 16,89 % ($p < 0,001$) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією та на 14,59 % ($p < 0,001$) менше порівняно із щурами контрольної групи.

7. Вміст натрію, кальцію, заліза та міді у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму на 3-тю добу остеогенезу зменшився на 37,47 % ($p < 0,001$), 22,21 % ($p = 0,115$), 33,66 % ($p < 0,001$) та 14,33 % ($p = 0,136$) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією без корекції. На 30-ту добу концентрація натрію була меншою на 25,98 % ($p < 0,001$), а міді на 29,74 % ($p = 0,001$) у регенераті тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму порівняно зі щурами із хронічною гіперглікемією без корекції. Достовірної різниці у показниках вмісту калію, кальцію та магнію у регенератах щурів контрольної групи та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму виявлено не було. Концентрація заліза у регенераті тварин із групи корекції була більше на 19,48 % ($p = 0,005$) відповідно контрольного показника, однак достовірно не відрізнялася від групи щурів із хронічною гіперглікемією без застосування збагаченої тромбоцитами плазми.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Prall J, Ross M. The management of work-related musculoskeletal injuries in an occupational health setting: the role of the physical therapist. *J Exerc Rehabil.* 2019;15(2):193-99. doi:10.12965/jer.1836636.318
2. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials.* 2018;185:240-75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.028
3. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future direction. *BMC. Medicine.* 2011;9:66. doi: 10.1186/1741-7015-9-66
4. Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J Dent Res.* 2011;90(9):1052-61. doi:10.1177/0022034510393967
5. Wang H, Ba Y, Xing Q, Du JL. Diabetes mellitus and the risk of fractures at specific sites: a meta-analysis. *BMJ Open.* 2019;9(1):e024067. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024067
6. Fan Y, Wei F, Lang Y, Liu Y. Diabetes mellitus and risk of hip fractures: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2016;27:219-228.
7. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol.* 2007;166:495-505.
8. Ferrari SL, Abrahamsen B, Napoli N, Akesson K, Chandran M, Eastell R et al. Diagnosis and management of bone fragility in diabetes: an emerging challenge. *Osteoporos Int.* 2018;29(12):2585-2596. doi: 10.1007/s00198-018-4650-2.
9. Hygum K, Starup-Linde J, Langdahl BL. Diabetes and bone. *Osteoporos Sarcopenia.* 2019;5(2):29-37. doi: 10.1016/j.afos.2019.05.001.

10. Sanches CP, Vianna AG, Barreto FC. The impact of type 2 diabetes on bone metabolism. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9:85. doi: 10.1186/s13098-017-0278-1.
11. Murray CE, Coleman CM. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4873. doi: 10.3390/ijms20194873
12. Scott J. Roberts, Hua Zhu Ke, Anabolic strategies to augment bone fracture healing, *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(3):289-298. doi:10.1007/s11914-018-0440-1
13. Kostenuik P, Mirza FM. Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion. *J Orthop Res*. 2017;35(2):213-223. doi:10.1002/jor.23460
14. D’Mello S, Atluri K, Geary SM, Hong L, Elangovan S, Salem AK. Bone regeneration using gene-activated matrices. *AAPS J*. 2017;19(1):43-53. doi:10.1208/s12248-016-9982-2
15. Reddi AH, Iwasa K. Morphogenesis, Bone Morphogenetic Proteins, and Regeneration of Bone and Articular Cartilage. 2019;405-416. doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00025-4
16. Lopez MJ. Bone biology and fracture healing. *Equine Surgion (fifth edition)* 2019;1255-1269
17. Baht GS, Vi L, Alman BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*. 2018;16:138-145. doi.org/10.1007/s11914-018-0423-2
18. Дедух НВ, Пошелок ДМ, Малышкина СВ. Моделирование и ремоделирование кости (обзор литературы). *Український морфологічний альманах*. 2014;12(1):107-111.
19. Hu DP, Ferro F, Yang F, Taylor AJ, Chang W, Miclau T, Marcucio RS, Bahney CS. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development*. 2017;144(2):221-234. doi:10.1242/dev.130807

20. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: Effects on osteoblast. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2012;68(7):1013-1018. doi: 10.1007/s00228-012-1216-7.
21. Komori T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12): 2045. doi: 10.3390/ijms17122045
22. Попков АВ, Осипенко АВ. Регенерация тканей при удлинении конечностей. Руководство для врачей. Москва, 2008;240 с.
23. Boyce BF, Li J, Xing L, Yao Z. Bone Remodeling and the Role of TRAF3 in Osteoclastic Bone Resorption. *Front Immunol.* 2018;9:2263. doi: 10.3389/fimmu.2018.02263
24. D’Mello S, Atluri K, Geary SM, Hongc L, Elangovan S, Sale AK. Bone regeneration using gene-activated matrices. *AAPS J.* 2017;19(1):43-53. doi:10.1208/s12248-016-9982-2
25. Коротков ДА, Иванова МЮ. Физиологическая и репаративная регенерация костной ткани. Молодежный научный форум: Естественные и медицинские науки. Электронный сборник статей по материалам XX студенческой международной заочной научно-практической конференции. – Москва: Изд. «МЦНО». – 2015. – № 1 (19). [http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/1\(19\).pdf](http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/1(19).pdf)
26. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future direction. *BMC Medicine.* 2011;9:66.
27. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lina T, Yao Z, Goodma SB. Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone.* 2016;86: 119-130. doi:10.1016/j.bone.2016.02.020
28. Рубленко МВ, Семеняк СА, Андрієць ВГ. Молекулярно-біологічні механізми репаративного остеогенезу. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2017;2:11-20

29. Franceschi RT, Ge C. Control of the Osteoblast Lineage by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Curr. Mol. Biol. Rep.* 2017;3(2):122-32. doi: 10.1007/s40610-017-0059-5
30. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest.* 2014;124(2):466-72. doi:10.1172/JCI70050
31. Бокарев АВ, Стекольников АА. Исследование ингибирования изоферментов щелочной фосфатазы сыворотки крови собак при разных режимах тепловой денатурации. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии.* 2010;1(5):8-18
32. Смирнов ИЕ, Рошаль ЛМ, Кучеренко АГ, Карасёва ОВ, Понина ИВ. Изменения содержания костных биомаркёров и цитокинов в сыворотке крови при сочетанной травме у детей. *Russian pediatric journal.* 2017;20(6) doi: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9561-2017-20-6-371-378>
33. Бумейстер ВІ, Погорелов МВ. Сучасний погляд на репаративний остеогенез. *Світ медицини та біології.* 2008;4:104-110.
34. Попсуйшапка ОК, Літвішко ВО, Ашукіна НО. Клініко-морфологічні стадії процесу зрощення відламків кістки. *Ортопедия, травматология и протезирование.* 2015;1:12-20.
35. Поворознюк ВВ, Корж НА, Григорьева НВ, Климовицки ФВ. Влияние «Бивалоса» на репаративную регенерацию кости: данные экспериментальных и клинических исследований. *Ортопедия, травматология и протезирование.* 2012;1:5-11
36. Бруско АТ, Гайко ГВ. Современные представления о стадиях репаративной регенерации костной ткани при переломах. *Вісник ортопедії, травматології та протезування.* 2014;2:5-8
37. Волотовский АИ, Макаревич ЕР, Чирак ВЭ. Регенерация костной ткани в норме и при патологии. 2010;24с.

38. Салеева ДВ. Регенерация кости: клетки и факторы роста. VI Международная студенческая научная конференция. 2014. Электронный ресурс. <https://scienceforum.ru/2014/article/2014001584>
39. Шапошников ЮГ. Травматология и ортопедия: в 3 т.: руководство для врачей под ред. Шапошникова ЮГ. М.:Медицина, 1997:68с.
40. Котельников ГП, Миронов СП, Мирошниченко ВФ. Травматология и ортопедия. М.:ГЭОТАР-Медиа, 2006;400 с.
41. Redfern R, Roberts CA. Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition). Trauma. 2019;211-284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809738-0.00009-0>
42. Stanovici J, Nail LLR, Brennan M, Vidal L, Trichet V, Rosset P, Layrolle P. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. Curr Res Transl Med. 2016;64(2):83-90. [10.1016/j.retram.2016.04.006](https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.006)
43. Virk MS, Lieberman JR. Biologic adjuvants for fracture healing. Arthritis Res Ther. 2012;14(6):225. doi: 10.1186/ar4053
44. Gamblin AL, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lézot F, Heymann D, et al. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. Biomaterials. 2014; 35:9660-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.018 gam
45. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. J Bone Miner Res. 2009;24:274-282.
46. Корж НА, Дедух НВ. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации. Ортопедия, травматология и протезирование. 2006;1:76-84.

47. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European cells & materials*. 2012;23:13-27.
48. Emara KM, Diab RA, Emara AK. Recent biological trends in management of fracture non-union. 2015;6(8):623-628. doi:10.5312/wjo.v6.i8.623
49. Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *J Cell Biochem*. 2010;109(2):302-11. doi:10.1002/jcb.22418.
50. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555.
51. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R. Effects of Aging on Fracture Healing. *Curr Osteoporos*. 2017;15(6):601-608. doi:10.1007/s11914-017-0413-9
52. Özkan S, Nolte PA, Bekerom MPJ, Bloemers FW. Diagnosis and management of long-bone nonunions: a nationwide survey. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;45(1):3-11. doi:10.1007/s00068-018-0905-z
53. Reznik L, Rozhkov K, Novikov A. Activation of Reparative Osteogenesis by Means of Ultrasonic Action in Treatment of Open Fractures. *Research & Reviews: Journal of Medical and Health Sciences*. 2017;6(2):8-11.
54. Безсмертний ЮО, Шевчук ВІ. Метаболічні предиктори порушення репаративного остеогенезу довгих кісток. *Проблеми травматології та остеосинтезу*. 2019;1(2):15-16
55. Standring S. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. USA: New York: Elsevier Limited; 2016 – 1562 p.
56. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11:45-54.

57. Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing *J Cell Physiol.* 2017;232(5):913-921. doi:10.1002/jcp.25641
58. Іванов ОМ. Застосування кріоконсервованого хоріона при розладах репаративного остеогенезу (експериментально-клінічне дослідження) Харків, 2016 – 224 с.
59. Schlundt C, Schell H, Goodman SB, Vunjak-Novakovic G, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *Journal of Experimental Orthopaedics.* 2015;2:1.
60. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature reviews Rheumatology.* 2015;11:45-54.
61. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16:427-434. doi:10.1089/ten.teb.2009.0687.
62. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic?. *Clin. Orthop. Relat Res.* 2000;378:224-237. doi:10.1097/00003086-200009000-00033
63. Lu C, Saless N, Wang X, Sinha A, Decker S, Kazakia G et al. The role of oxygen during fracture healing. *Bone.* 2013;52(1):220-229. doi:10.1016/j.bone.2012.09.037
64. Измайлов СГ, Бесчастнов ВВ, Рябков МГ, Леонтьев АЕ, Лукоянычев ЕЕ, Багрянцев МВ, Орлинская НЮ. Роль фактора, индуцированного гипоксией, в регулировании кислородного гомеостаза в процессе репаративной регенерации в условиях скомпрометированной микроциркуляции. *Альманах клинической медицины.* 2017;45(8):674-680. doi:10.18786/2072-0505-2017-45-8-674-680

65. Beamer B, Hettrich C, Lane J. Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *HSSJ*. 2010;6(1):85-94. doi:10.1007/s11420-009-9129-4
66. Fröhlich LF. MicroRNAs at the Interface between Osteogenesis and Angiogenesis as Targets for Bone Regeneration. *Cells*. 2019;8(2):121. doi:10.3390/cells8020121
67. Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T et al. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol*. 2008;215(1):234-242. doi: 10.1002/jcp.21309
68. Yuasa M, Mignemi NA, Barnett JV, Cates JMM, Nyman JS, Okawa A et al. The temporal and spatial development of vascularity in a healing displaced fracture. *Bone*. 2014;67:208-21. doi:10.1016/j.bone.2014.07.002
69. Ma XL, Sun XL, Wan CY, Ma JX, Tian P. Significance of circulating endothelial progenitor cells in patients with fracture healing process. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012;30(11):1860-1866. doi.org/10.1002/jor.22134
70. Hu DP, Ferro F, Yang F, Taylor AJ, Chang W, Mclau T, Marcucio RS, Bahney CS. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development*. 2017;144(2):221-234. doi: 10.1242/dev.130807
71. Baht GS, Vi L, Alman BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*. 2018;16:138-145. doi.org/10.1007/s11914-018-0423-2
72. Stroncek JD, Reichert WM. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. In: *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2008. Chapter 1. 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21204404/>

73. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau T, Marcucio RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res.* 2010;28(6):778-784. doi:10.1002/jor.21061
74. Brown ML, Yukata K, Farnsworth CW, Chen DG, Awad H, Hilton MJ, O'Keefe RJ et al. Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e99656. doi: 10.1371/journal.pone.0099656
75. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, BD Graves, Einhorn TA. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):285-294. doi: 10.1159/000047893
76. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Camacho NP, Bostrom MPG. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone.* 2007;41:928-936. doi: 10.1016/j.bone.2007.07.022
77. Hurley MM, Adams DJ, Wang L, Jiang X, Burt PM, Du E, Xiao L. Accelerated fracture healing in transgenic mice overexpressing an anabolic isoform of fibroblast growth factor 2. *J Cell Biochem.* 2016;117:599-611. <https://doi.org/10.1002/jcb.25308>
78. Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Cell Physiol.* 2018;233(4):2937-2948. doi: 10.1002/jcp.26042.
79. Lochab AK, Extavour CG. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in animal reproductive system development and function. *Dev Biol.* 2017;427(2):258-269. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.002.
80. Rauner M, Baschant U, Roetto A, Pellegrino RM, Rother S, Salbach-Hirsch J, Weidner H et al. Transferrin receptor 2 controls bone mass and pathological bone formation via BMP and Wnt signaling. *Nat Metab.* 2019;1(1):111-124. doi: 10.1038/s42255-018-0005-8

81. Dighe AS, Yang S, Madhu V, Balian G, Cui Q. Interferon gamma and T cells inhibit osteogenesis induced by allogeneic mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res.* 2013;31(2):227–34. doi: 10.1002/jor.22212
82. Toben D, Schroeder I, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann JE, Frisch JT, et al. Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):113-24. doi: 10.1002/jbmr.185
83. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, Dahne M et al. Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra36. doi: 10.1126/scitranslmed.3004754
84. Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;367:113-32. doi: 10.1007/82_2012_291
85. Baker CE, Moore-Lotridge SN, Hysong AA, Posey SL, Robinette P, Blum DM, Benvenuti MA et al. Bone Fracture Acute Phase Response-A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism.* 2018;16:142-158. <https://doi.org/10.1007/s12018-018-9256-x>
86. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(11):1215-28. doi: 10.1369/jhc.6A6959.2006
87. Keramaris NC, Kaptanis S, Moss HL, Loppini M, Pneumaticos S, Maffulli N. Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in bone healing. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012;7(4):293-301. doi: 10.2174/157488812800793081
88. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci.* 2015;28(1):57-71. doi: 10.3967/bes2015.006

89. Fidan N, Inci A, Coban M, Ulman C, Kursat S. Bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in predialysis patients with chronic kidney disease. *J. Investig. Med.* 2016;64(4):861-866. doi: 10.1136/jim-2015-000043
90. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 2011;343:289-302. doi: 10.1007/s00441-010-1086-1
91. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: Effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68:1013-1018. doi: 10.1007/s00228-012-1216-7
92. Левченко ОО. Основні механізми ремоделювання кісткової тканини. *Дерматологія та венерологія.* 2016;2:5-12
93. Cooper KL, Oh S, Sung Y, Dasari RR, Kirschner MW, Tabin CJ. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature.* 2013;495(7441):375-378. doi: 10.1038/nature11940
94. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12): 1392-404. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.019
95. Colnot C, Zhang X, Tate MLK. Current Insights on the Regenerative Potential of the Periosteum: Molecular, Cellular & Endogenous Engineering Approaches. *J Orthop Res.* 2012;30(12):1869-1878. doi: 10.1002/jor.22181
96. Glatt V, Evans CH, Stoddart MJ. Regenerative rehabilitation: The role of mechanotransduction in orthopaedic regenerative medicine. *J Orthop Res.* 2019;37(6):1263-1269. doi: 10.1002/jor.24205.
97. Рубленко МВ, Семеняк СА, Андрієць ВГ. Молекулярно-біологічні механізми репаративного остеогенезу. *Науковий вісник ветеринарної медицини.* 2017;2:11-20

98. Dam TT, Harrison S, Fink HA, Ramsdell J, Barrett-Connor E. Bone mineral density and fractures in older men with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Osteoporosis International*. 2010; 21(8):1341-1349. doi: 10.1007/s00198-009-1076-x
99. Бур'янов ОА, Скляренко ЄТ, Волошин ОІ, Кваша ВП, Задніченко МО, Грек ВП, Омельченко ТМ. та ін. Лекція для студентів медичних та медико-психологічних факультетів вищих медичних навчальних закладів України на тему: «Запальні захворювання системи руху та опори». *Літопис травматології та ортопедії*. 2014;1(2):189-206.
100. Wagner DR, Karnik S, Gunderson ZJ, Nielsen JJ, Fennimore A, Promer HJ, Lowery JW et al. Dysfunctional stem and progenitor cells impair fracture healing with age. *World J Stem Cells*. 2019;11(6):281-296. doi: 10.4252/wjsc.v11.i6.281
101. Бруско АТ, Гайко ГВ. Современные представления о стадиях репаративной регенерации костной ткани при перелома. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*. 2014;2:5-8
102. Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskyi DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. *Analytical Cellular Pathology*. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>
103. Ілляшенко ВЮ, Ткач ГФ, Максимова ОС, Ткаченко АС, Дудченко ЄС, Тимошенко ОО, Дейнеко ОС. Спосіб комплексного визначення вмісту макро- і мікроелементів в органах лабораторних щурів у нормі і при патологічних процесах. Патент на корисну модель № 141361. МПК 2020.01. №и 2019 08297; заявл. 2019-07-16; опубл. 2020-04-10, Бюл. № 7.

104. Ілляшенко ВЮ, Ткач ГФ, Максимова ОС, Ткаченко АС, Дудченко ЄС, Муравський ДВ, Дейнеко ОС. Препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент на корисну модель № 145726. МПК 2021.01. № u 2020 05430; заявл. 2020-08-21; опубл. 2020-12-28, Бюл. № 24.
105. Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045
106. Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
107. Дудченко ЄС. Особливості структурної організації регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№4(26):79-85. doi: 10.26693/jmbs05.04.079.
108. Tkach G, Maksymova O, Dudchenko Ye, Illiashenko V, Tymoshenko A. The posttraumatic regeneration of long bone diaphysis in animals with chronic hyperglycemia. XXVI International Symposium on Morphological Sciences, Prague, July 5-7 2018. – P. 73-74.
109. Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Максимова ОС, Годовас ДВ, Даниленко МІ. Хімічний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали другої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». м. Дніпро. 10-12 жовтня 2018 року. С. 58-59.

110. Дудченко Є, Ткач Г, Ілляшенко В, Максимова О. Макро- та мікроелементний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікроелементології» присвяченій пам'яті академіка Ю. І. Кундієва, м.Київ, 4-5 жовтня 2018 року. С. 31-32.
111. Дудченко ЄС, Сікора ВЗ, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерата довгих трубчастих кісток скелета при хронічній гіперглікемії організму та спрямованій остеотропній терапії збагаченої тромбоцитами плазми. Науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної морфології» присвячена 100-річчю з дня народження професора Олександра Гавриловича Яхницьі та 65-річчю з дня народження професора Миколи Анатолійовича Волошина, м. Запоріжжя, 3-4 жовтня 2020 року. С. 55-56
112. Дудченко ЄС, Пастухова КО, Сухонос ОВ, Даниленко МІ, Літовченко БМ. Особливості макро- та мікроелементного складу тканин скелетно-язової системи задньої кінцівки щурів зрілого віку у нормі. Матеріали II міжнародної науковопрактичної конференції «Сучасні наукові інновації», м. Київ, 24-25 лютого 2018 року (частина I). С. 41-42.
113. Dudchenko Ye, Tkach G, Tymoshenko A, Tkachenko A, Maksymova O. Scanning electron microscopy analyses of bone posttraumatic regeneration in animals with chronic hyperglycemia. Матеріали тез доповідей VII конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України, м. Одеса, 2-4 жовтня 2019 року. С. 200.
114. Jeong SH, Jung BH, Yoo KY, Um HS, Chang BS, Lee JK, Choi WY. Determination of the optimal diabetes duration for bone regeneration experiments in an alloxan-induced diabetic rabbit calvarial defect model. 2018;48(6):383-394. doi: 10.5051/jpis.2018.48.6.383

115. B. Lecka-Czernik. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology. *Diabetologia*. 2017;60(7):1163-1169. doi:10.1007/s00125-017-4269-4
116. World Health Organization. Global report on diabetes. 2016:88. ISBN: 978 92 4 156525 7
117. Creecy A, Uppuganti S, Unal M, Bunn RC, Voziyan P, Nyman JS. Low bone toughness in the TallyHO model of juvenile type 2 diabetes does not worsen with age bone. 2018;110:204-214. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.005
118. Sadighi A, Bazavar M, Niafar M, Tabrizi A, Doorandish N. Effect of diabetes mellitus type II on long bones fractures healing. *Advances in Bioscience and Clinical Medicine*. 2015;3(3):10-16. doi: 10.7575/aiac.abcmed.15.03.03.03
119. Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Graves DT. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone*. 2009;44(2):357-363. doi: 10.1016/j.bone.2008.10.042
120. Сироджов КХ, Рахимов АТ, Исупов ША, Бегов АХ, Сироджзода М, Холов ДИ. Оптимизация комплексного лечения осложненного перелома костей голени у больных сахарным диабетом. Учебное пособие. 2018:56 с.
121. Ялочкина ТО, Белая ЖЕ. Низкотравматичные переломы и костное ремоделирование при сахарном диабете 2 тип. Ожирение и метаболизм. 2017;14(3):11-18. doi: 10.14341/ОМЕТ2017311-18
122. Сафарова СС. Оценка ремоделирования костной ткани у пациентов с сахарным диабетом 2 тип. Запорожский медицинский журнал. 2019;21,№1(112):60-63. doi: 10.14739/2310-1210. 2019.1.15581
123. Marin C, Luyten FP, Van der Schueren B, Kerckhofs G, Vandamme K. The impact of type 2 diabetes on bone fracture healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(6):1-15. doi: 10.3389/fendo.2018.00006
124. Hygum K, Starup-Linde J, Langdahl BL. Diabetes and bone. *Osteoporos Sarcopenia*. 2019;5(2):29-37. doi: 10.1016/j.afos.2019.05.001

125. Fontaine JL, Hunt NA, Curry S, Kearney T, Jupiter D, Shibuya N, LA Lavery. Fracture healing and biomarker expression in a diabetic Zucker rat model. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2014;104(5):428-33. doi: 10.7547/0003-0538-104.5.428
126. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes – a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2007;18(4):427-444. doi: 10.1007/s00198-006-0253-4
127. Bahrambeigia S, Yousefib B, Rahimib M, Shafiei-Irannejada V, Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;109:1593-1601. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.032
128. Katsuhiko M, Hui Teoh S, Yamashiro H, Shinohara M, Fatchiyah F, Ohta T, Yamada T. Effects on glycemic control in impaired wound healing in spontaneously diabetic Torii (SDT) fatty rats. *Med Arch.* 2018;72(1):4-8. doi: 10.5455/medarh.2018.72.4-8
129. Дедух НВ, Сыкал АА. Регенерация кости при сахарном диабете 2 типа (экспериментальное исследование). *Проблемы остеологии.* 2015;18(4): 12-18.
130. Leslie WD, Rubin MR, Schwartz AV, Kanis JA. Type 2 diabetes and bone. *J Bone Miner Res.* 2012;27(11):2231-2237. doi: 10.1002/jbmr.1759
131. Paschou SA, Dede AD, Anagnostis PG, Vryonidou A, Morganstein D, Goulis DG. Type 2 diabetes and osteoporosis: a guide to optimal management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3621-3634. doi: 10.1210/jc.2017-00042.
132. Hamann C, Kirschner S, Gunther KP, Hofbauer LC. Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8:297-305. doi: 10.1038/nrendo.2011.233
133. Farr JN, Khosla S. Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans. *Bone.* 2016;82:28-34. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.027.

134. Napoli N, Strotmeyer ES, Ensrud KE, Sellmeyer DE, Bauer DC, Hoffman AR, Dam TTL, Barrett-Connor E, Palermo L, Orwoll ES, et al Fracture risk in diabetic elderly men: the MrOS study. *Diabetologia*. 2014;57(10):2057-2065. doi: 10.1007/s00125-014-3289-6
135. Moreira CA, Dempster DW. Bone histomorphometry in diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2015;26(11):2559-2560. doi: 10.1007/s00198-015-3258-z.
136. Napoli N, Schwartz AV, Black DM. Reply to: indications of increased vertebral fracture risk in patients with type 2 diabetes. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2017;33(1):183. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3322>
137. Moreira CA, Barreto FC, Dempster DW. New insights on diabetes and bone metabolism. *J Bras Nefrol*. 2015;37(4):490-495. doi: 10.5935/0101-2800.20150077.
138. Epstein S, Defeudis G, Manfrini S, Napoli N, Pozzilli P. Diabetes and disordered bone metabolism (diabetic osteodystrophy): time for recognition. *Osteoporos Int*. 2016;27:1931-1951. doi: 10.1007/s00198-015-3454-x.
139. Chaiban JT, Nicolas KG. Diabetes and bone: still a lot to learn. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2015;13(1):20-35. doi: 10.1007/s12018-015-9178-9.
140. Oei L, Rivadeneira F, Zillikens MC, Oei EHG. Diabetes, diabetic complications, and fracture risk. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(2):106-115. doi: 10.1007/s11914-015-0260-5
141. Schwartz AV, Ewing SK, Porzig AM, McCulloch CE, Resnick HE, Hillier TA, Ensrud KE, Black DM, Nevitt MC, Cummings SR, Sellmeyer DE. Diabetes and change in bone mineral density at the hip, calcaneus, spine, and radius in older women. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:62. doi: 10.3389/fendo.2013.00062
142. Близнюк ЯО, Кирилюк МЛ. ЦД та остеопенічний синдром у чоловіків. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2015;2:7-20.

143. Mangialardi G, Ferland-McCollough D, Maselli D, Santopaolo M, Cordaro A, Spinetti G, Sambataro M, Sullivan N, Blom A, Madeddu P. Bone marrow pericyte dysfunction in individuals with type 2 diabetes. 2019;62(7):1275-1290. doi: 10.1007/s00125-019-4865-6
144. Farr JN, Khosla S. Determinants of Bone Strength and Quality in Diabetes Mellitus in Humans. *Bone*. 2016;82:28-34. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.027
145. Thrailkill K, Bunn RC, Lumpkin C, Jr, Wahl E, Cockrell G, Morris L, et al. Loss of insulin receptor in osteoprogenitor cells impairs structural strength of bone. *J Diabetes Res*. 2014;2014:9. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/703589>
146. Oei L, Zillikens MC, Dehghan A, Buitendijk GH, Castano-Betancourt MC, Estrada K, Stolk L, et al. High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of inadequate glucose control: the Rotterdam Study. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1619-1628. doi: 10.2337/dc12-1188
147. Sanches CP, Vianna AGD, Barreto FC. The impact of type 2 diabetes on bone metabolism. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9:85. doi: 10.1186/s13098-017-0278-1
148. Niu T, Rosen CJ. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene*. 2005;361:38-56. doi:10.1016/j.gene.2005.07.016
149. Rubin MR. Bone cells and bone turnover in diabetes mellitus. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(3):186-91. doi:10.1007/s11914-015-0265-0
150. Сыкал АА, Дедух НВ. Морфология костной ткани у животных с сахарным диабетом 2 типа. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015;4, 2(125):301-305.
151. Івченко АВ. Оптимізація регенерації кісткової тканини при лікуванні переломів довгих кісток кінцівок у хворих на ЦД. *Український медичний альманах*. 2012;15(3):204-206.
152. Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy – future or trend? *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):219. doi: 10.1186/ar3914.

153. Bakhtiar H, Esmaeili S, Tabatabayi SF, Ellini MR, Nekoofar MH, Dummer PMH. Second-generation Platelet Concentrate (Platelet-rich Fibrin) as a Scaffold in Regenerative Endodontics: A Case Series. 2017;43(3):401-408. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.016.
154. Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR, Gibb SL, Keating S, Danesh A, Beyer A et al. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. 2016;56:52-64. doi: 10.1111/trf.13455.
155. Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, Denom J, Menzel U, Alini M, Verrier S, Herrmann M. An in Vitro Investigation of Platelet-Rich Plasma-Gel as a Cell and Growth Factor Delivery Vehicle for Tissue Engineering. 2016;22(1):49-58. doi: 10.1089/ten.tec.2015.0223.
156. Xiao SE, Miao Y, Wang J, Jiang W, Fan ZX, Liu XM, Hu ZQ. As a carrier-transporter for hair follicle reconstitution, platelet-rich plasma promotes proliferation and induction of mouse dermal papilla cells. 2017;7(1):1-11. doi: 10.1038/s41598-017-01105-8.
157. Germanovich K, Femia EA, Cheng CY, Dovlatova N, Cattaneo M. Effects of pH and concentration of sodium citrate anticoagulant on platelet aggregation measured by light transmission aggregometry induced by adenosine diphosphate. *Platelets.* 2018;29(1):21-26. doi: 10.1080/09537104.2017.1327655
158. Rojas S, Pérez del Caz MD, Esteban Vico JR, Villaverde E, Llinas A, Martínez JR, Brage C et al. EHTIC study: Evaluation of a new hemostatic agent based on tissue factor in skin grafting procedures. 2017;43(4):780-788. doi: 10.1016/j.burns.2017.01.007
159. Giraldo CE, Álvarez ME, Carmona JU. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res.* 2015;11:60. doi: 10.1186/s12917-015-0370-4

160. Zhang J, Nie D, Williamson K, Rocha JL, Hogan MCV, Wang JHC. Selectively activated PRP exerts differential effects on tendon stem/progenitor cells and tendon healing. *J Tissue Eng.* 2019;10:2041731418820034. doi: 10.1177/2041731418820034
161. Andia I, Martin JI, Maffulli N. Platelet-rich Plasma and Mesenchymal Stem Cells: Exciting, But ... are we there Yet? *Sports Med Arthrosc Rev.* 2018;26(2):59-63. doi: 10.1097/JSA.0000000000000191
162. Waters JH, Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J. Extra Corpor. Technol.* 2004;36(3):250-4.
163. Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, Della Bella E, Sartori M, Fini M. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook. *BioMed Research International.* 2015;24 doi: 10.1155/2015/846045
164. Augustine TN, Van Der Spuy WJ, Kaberry LL, Shayi M. Thrombin-Mediated Platelet Activation of Lysed Whole Blood and Platelet-Rich Plasma: A Comparison between Platelet Activation Markers and Ultrastructural Alterations. *Microsc Microanal.* 2016;22(3):630-639. doi: 10.1017/S1431927616000854
165. Fioravanti C, Frustaci I, Armellini E, Condò R, Arcuri C, Cerroni L. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. *Oral Implantol (Rome).* 2016;8(4):96-113. doi: 10.11138/orl/2015.8.4.096
166. Law JX, Chowdhury SR, Saim AB, Idrus RB. H. Platelet-rich plasma with keratinocytes and fibroblasts enhance healing of full-thickness wounds. 2017;26(3):208-215. doi: 10.1016/j.jtv.2017.05.003
167. Suthar M, Gupta S, Bukhari S, Ponemone V. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):16. doi: 10.1186/s12929-017-0324-1

168. Johal H, Khan M, Yung SP, Dhillon MS, Fu FH, Bedi A, Bhandari M. Impact of Platelet-Rich Plasma Use on Pain in Orthopaedic Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Health*. 2019;11(4):355-366. doi: 10.1177/1941738119834972
169. Park YG, Lee IH, Park ES, Kim JY. Hydrogel and platelet-rich plasma combined treatment to accelerate wound healing in a nude mouse model. 2017;44(3):194-201. doi: 10.5999/aps.2017.44.3.194
170. Myung H, Jang H, Myung JK, Kim MJ, Lee SB, Jang WS, Lee SJ et al. A Method for the Activation of Platelet-Rich Plasma via Bead Mill Homogenizer for Mesenchymal Stem Cell Culture. 2017;23(8):465-473. doi: 10.1089/ten.tec.2017.0178.
171. Zhang Y, Morgan BJ, Smith R, Fellows CR, Thornton C, Snow M, Francis LW, Khan IM. Platelet-rich plasma induces post-natal maturation of immature articular cartilage and correlates with LOXL1 activation. 2017;7:3699. doi: 10.1038/s41598-017-02297-9
172. Badran Z, Abdallah MN, Torres J, Tamimi F. Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges. 2018;29(2):105-112. doi: 10.1080/09537104.2017.1327656
173. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med*. 2008;42(5):314-20. doi: 10.1136/bjsm.2007.040071
174. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. 2013;195(5):461-466. doi: 10.1016/j.aanat.2013.04.004
175. Gajovich IV. Application of platelet-rich plasma (PRP) in traumatic damages of ligaments (review of the literature). *The problems of traumatology and osteosynthesis*. 2015;2(2):55-81.

176. Gholami M, Ravaghi H, Salehi M, Yekta AA, Doaee S, Jaafaripooyan E. A systematic review and meta-analysis of the application of platelet rich plasma in sports medicine. *Electron Physician*. 2016;8(5): 2325-2332. doi: 10.19082/2325
177. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What Is Platelet-Rich Plasma? *Oper Tech Sports Med*. 2011;19(3):142–8. doi: 10.1053/j.otsm.2010.12.001.
178. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8. doi: 10.1097/00008505-200110000-00002
179. Yu T, Pan H, Hu Y, Tao H, Wang K, Zhang C. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J Orthop Surg Res*. 2017;12(1):178. doi: 10.1186/s13018-017-0665-1
180. Малыгина МА, Боровкова НВ, Сахарова ОМ, Пономарев ИН. Применение богатой тромбоцитами плазмы при заболеваниях и повреждениях опорно-двигательного аппарата. *Трансплантология*. 2017;9(4):325-334. doi:10.23873/2074-0506-2017-9-4-325-334
181. Бурьянов ОА, Омельченко ТН, Ярмолюк ЮА, Вакулич МВ. Регенерация кости при использовании аутогенной костной ткани и фибрина, обогащенного тромбоцитами. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017;1(135):96-99.
182. Климовицкий ВГ, Соловьев ИА. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в лечении повреждений мягких и костных тканей (обзор литературы). *Травма*. 2015;16(6):77-80.
183. Варес ЯЕ, Сліпий ВЗ. Застосування збагаченого тромбоцитами фібрину в хірургічній стоматології. Частина II. Заміщення внутрішньокісткових дефектів щелеп. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016;4(1):21-24.

184. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, De La Fuente M, Azofra J, Andía I. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(12):1769-1772. doi: 10.1093/rheumatology/kem234
185. Velich N, Kovacs K, Huszar T, Semjen G, Reiczigel J, Szabo G, Suba Z. The effect of platelet-rich plasma on new bone formation by augmentation with osseoconductive bone substitute material in beagle dogs. *Fogorv Sz.* 2004;97(1):23-27
186. Брехов ВЛ. Хирургическое лечение больных с дефектами костной и хрящевой тканей с применением богатой тромбоцитами аутоплазмы. Автореф. дис. на соискание ученой степени к.мед.н.: спец. 14.00.27, Курск, 2007.
187. Du L, Miao Y, Li X, Shi P, Hu Z. A Novel and Convenient Method for the Preparation and Activation of PRP without Any Additives: Temperature Controlled PRP. *Biomed Res Int*. 2018;1761865. doi: 10.1155/2018/1761865
188. Somani A, Rai R. Comparison of efficacy of autologous platelet-rich fibrin versus saline dressing in chronic venous leg ulcers: A randomised controlled trial. 2017;10(1):8-12. doi: 10.4103/JCAS.JCAS_137_16
189. Pandey S, Hickey DU, Drum M, Millis DL, Cekanova M. Platelet-rich plasma affects the proliferation of canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):269. doi: 10.1186/s12917-019-2010-x
190. Kuffler DP. Variables affecting the potential efficacy of PRP in providing chronic pain relief. *J Pain Res*. 2019;12:109-116. doi: 10.2147/JPR.S190065
191. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37(11):2259-72. doi: 10.1177/0363546509349921

192. Roubelakis MG, Trohatou O, Roubelakis A, Mili E, Kalaitzopoulos I, Papazoglou G, Pappa KI, Anagnou NP. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev Rep*. 2014;10(3):417-28. doi: 10.1007/s12015-013-9494-8
193. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009
194. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;13(7):1185-95. doi: 10.2174/138920112800624283
195. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012;28(7):998-1009. doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148
196. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets*. 2017;29(1):48-55. doi: 10.1080/09537104.2017.1293807
197. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS, Nally M et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. 2017;29(2):171-184. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812
198. Cabaro S, D'Esposito V, Gasparro R, Borriello F, Granata F, Mosca G, Passaretti F et al. White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. 2018;29(5):463-467. doi: 10.1080/09537104.2017.1319046

199. Abd El Raouf M, Wang X, Miusi S, Chai J, AbdEl-Aal ABM, Helmy MMN, Ghanaati S et al. Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. 2019;30(2): 213-221. doi: 10.1080/09537104.2017.1401058
200. Bergeson AG, Tashjian RZ, Greis PE, Crim J, Stoddard GJ, Burks RT. Effects of platelet-rich fibrin matrix on repair integrity of at risk rotator cuff tears. *Am. J. Sports Med.* 2012;40(2):286-93. doi: 10.1177/0363546511424402
201. Rybin AV, Kuznetsov IA, Netylko GI, Rumakin VP, Rykov YA. Use of platelet-rich plasma for bioplastic processes stimulation after arthroscopic reconstruction of anterior cruciate ligament (review). *Traumatology and Orthopedics of Russia.* 2015;2(76):106-116. doi: 10.21823/2311-2905-2015-0-2-106-116
202. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support its Use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2004;62(4):489-496. doi: 10.1016/j.joms.2003.12.003
203. Івченко ДВ, Мірошніков ВВ. Застосування аутологічної плазми, що збагачена тромбоцитами, для оптимізації репаративної регенерації кісткової тканини при остеопенії. *Патологія.* 2018;15,2(43):248-258. doi: 10.14739/2310-1237. 2018.2.141333
204. Makarov MS, Ponomarev IN. Platelet rich plasma in bones defects regeneration. *Khirurgiia (Mosk).* 2015;(10):94-99. doi: 10.17116/hirurgia20151094-99
205. Szkudelski T. The Mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Ibed.* 2001;50(6):536-546.
206. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216-226.
207. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (Review). *Acta Physiologica Hungarica.* 2014;101(4):408-420. doi: 10.1556/APhysiol.101.2014.4.2.

208. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* 2007;125(3):451-72.
209. Shteynle AV. Post-traumatic bone tissue regeneration (part 1). *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* 2009;4(1):101-8.
210. Danilov RK. Histological basis of tissue regeneration of the musculoskeletal system. *Ortopedicheskaya travmatologiya.* 2000;2:102.
211. Desyatnichenko KS. About the nature of the Ilizarov effect. *Ortopedicheskaya travmatologiya.* 2000; 2: 102-3.
212. Avrunin AS, Iof ID. Reconstruction of the bone mineral matrix. *Morfologiya.* 2001;2:37-40.
213. Hankemeier S, Grässel S, Plenz G, Spiegel HU, Bruckner P, Probst A. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res.* 2001;19(4):531-8.
214. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003;52:1502-1510. doi: 10.2337/diabetes.52.6.1502.
215. Kayal RA, Siqueira M, Alblowi J, McLean J, Krothapalli N, Faibish D et al. TNF-alpha mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25:1604-1615.
216. Panahi G, Pasalar P, Zare M, Rizzuto R, Meshkani R. High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress-mediated activation of NF- κ B, and MAPK pathways in HepG2 cells. *Arch. Physiol. Biochem.* 2018;124:468-474. doi: 10.1080/13813455.2018.1427764.
217. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2003;144:346-352.

218. Malygina MA, Borovkova NV, Sakharova OM, Ponomarev IN. The use of platelet-rich plasma in diseases and injuries of the musculoskeletal system. *Transplantologiya*. 2017;9(4):325-34. doi: 10.23873/2074-0506-2017-9-4-325-334
219. Badr M, Coulthard P, Alissa R, Oliver R. The efficacy of platelet rich plasma in grafted maxil lae. A randomized clinical trial. *European Journal Oral Implantology*. 2010;3(3):233-44.
220. Tengbo Yu, Huazheng Pan, Yanling Hu et al. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J. Orthop. Surg. Res*. 2017;12:178. doi: 10.1186/s13018-017-0665-1.
221. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89(3):417-20. doi: 10.1302/0301-620X.89B3.18491.
222. Devi TR, Hijam D, Dubey A, Debnath S, Oinam P, Devi NGT, Singh WG. Study of Serum Zinc and Copper levels in Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Contemporary Medical Research*. 2016;3(4): 1036-1040.
223. Di-Silvestro RA. Zinc in relation to diabetes and oxida tive disease. *J Nutr* 2000;130:1509-11.
224. Zarga AH, Shah NA. Copper, zinc and magnesium levels in non insulin dependent diabetes mellitus. *Postgrad Med J* 1998;74:665-668.
225. Walter RM, Urik-Hare JY, Oliu KL, et al. Copper, zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991;44:1050-6.
226. Hannan M, Raines DA. Urinary excretion of chromium, copper and manganese in diabetes mellitus and associated disorders. *Diabetes Care* 1991;18:129-34.

227. Cunningham J, Leffell M, Mearkle P, Harmatz P. Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism*. 1995;44:996-9.
228. Mosad A, AbouSeif, Ab Allah Yousef. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *ClinicaChemicaActa*. 2004;346:161-170.

Додаток 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Буковинського державного медичного
університету
доцент _____ І.В. Геруш
« _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження).

2. Установа-розробник: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович.

3. Джерела інформації:

3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)

3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045

3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини ім. М.Г. Туркевича Буковинського державного медичного університету.

5. Термін впровадження: листопад-грудень 2020 року.

6. Форма впровадження: введено у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії.

7. Зауваження та пропозиції: не поступило.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри анатомії людини ім. М.Г. Туркевича. Протокол № 33 від 26 листопада 2020 року.

**Завідувач кафедри анатомії людини
імені М.Г. Туркевича
Буковинського державного
медичного університету
доктор медичних наук, професор**



В.В. Кривецький

Додаток 3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова

проф. О.В. Власенко

« 2 » 03 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу та навчальний процес

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості репаративного остегенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатоμο-експериментальне дослідження).
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович.
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020. Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)
 - 3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045
 - 3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра клінічної анатомії та оперативної хірургії.
5. **Результат застосування** пропозиції за період з січня 2021 року по лютий 2021 року. Матеріали використовуються у науковій та навчальній роботі кафедри клінічної анатомії та оперативної хірургії.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень дозволило розширити знання щодо структурних змін репаративного остегенеза за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії.
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
8. **Обговорено і затверджено** на засідання кафедри, протокол № 2 від 1.03 2021 р.

Відповідальна за впровадження особа:
завідувач кафедри клінічної анатомії
та оперативної хірургії
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України,
доктор медичних наук, професор

В.І. Півторак

Додаток 4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
ДЗ«Дніпропетровська медична
академія МОЗ України»

проф. О.О. Гудар'ян



2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу та навчальний процес

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анато́мо-експериментальне дослідження)

2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович.

3. **Джерела інформації:**

3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)

3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5.№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045

3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737

1. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра клінічної анатомії, анатомії та оперативної хірургії ДЗ«Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

2. **Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

3. **Форми впровадження:** у наукову роботу кафедри, а також у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії.

4. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

5. **Обговорено і затверджено** на засідання кафедри, протокол № 6 від 18.01, 2021 р.

Завідувач кафедри клінічної анатомії,
анатомії та оперативної хірургії
д.мед.н., професор

О.О. Нефьодова

Відповідальна за впровадження особа:
Професор кафедри клінічної анатомії,
анатомії та оперативної хірургії
д.мед.н., професор

В.В. Кошарний

Додаток 5



«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
НУФВСУ
проф. Дутчак М.В.
04 02 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у навчальний процес

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження).
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020. Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)
 - 3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045
 - 3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Національний університет фізичного виховання і спорту України, кафедра медико-біологічних дисциплін.
5. **Результат застосування** пропозиції за період з 1 січня 2021 року по 28 лютого 2021 року. Матеріали використовуються навчальній роботі кафедри медико-біологічних дисциплін.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень дозволило розширити знання щодо структурних змін процесу відновлення кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії.
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
8. **Обговорено і затверджено** на засідання кафедри, протокол № 8 від 21.01.2021 р.

Відповідальна за впровадження:
завідувач кафедри медико-біологічних дисциплін,
доктор медичних наук, професор

В.А. Пастухова.

04. 02. 2021 р.

ІТІС Гр. Пастухової В.А.
ЗАСВІДЧУЮ
04 02 2021 р.

Нагальський В.А.
А.І. Менашик



Додаток 6

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
проф. Гжегошкый М.Р.



2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфологічно-функціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження).
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1 DudchenkoYS, MaksymovaOS, PikaliukVS, MuravskiyDV, KyptenkoLI, TkachGF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)
 - 3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49.doi: 10.26693/jmbs05.01.045
 - 3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ЛНМУ ім. Данила Галицького, кафедра оперативної хірургії з топографічної анатомією.
5. **Результат застосування** пропозиції за період з 1 січня 2021 року по 28 лютого 2021 року. Матеріали використовуються у науковій та навчальній роботі кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень дозволило розширити знання щодо структурних змін процесу відновлення кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії.
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
8. **Обговорено і затверджено** на засіданні кафедри, протокол № 8 від 21 січня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри,
оперативної хірургії
з топографічною анатомією
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
д. мед. наук, професор

З.З. Масна

Додаток 7

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Ищенко Н.М.

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження).

2. Установа-розробник: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович.

3. Джерела інформації:

3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)

3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045

3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Чорноморський національний університет ім. Петра Могили кафедра анатомії, клінічної анатомії, оперативної хірургії, патоморфології та судової медицини

5. Термін впровадження: січень-лютий 2021 року.

6. Форма впровадження: в наукову роботу кафедри.

7. Зауваження та пропозиції: не поступило.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри. Протокол № 7 від 1 лютого 2021 року

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри анатомії, клінічної анатомії, оперативної хірургії, патоморфології та судової медицини
д. мед. н., професор

Підпис Черно В.С. засвідчую
Начальник ВК [підпис] О.А. Сагню



Черно В. С.

Додаток 8



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного
медичного університету,
д. мед. н., проф.

Шмакова І. П.

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу та навчальний процес

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження).
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович
3. **Джерела інформації:**
 - 3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)
 - 3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045
 - 3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Одеський національний медичний університет, кафедра нормальної та патологічної клінічної анатомії.
5. **Результат застосування** пропозиції за період з 1 січня 2021 року по 28 лютого 2021 року. Матеріали використовуються у науковій та навчальній роботі кафедри анатомії людини.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень дозволило розширити знання щодо структурних змін процесу відновлення кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії.
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
8. **Обговорено і затверджено** на засідання кафедри, протокол № 7 від 11. 01. 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри нормальної
та патологічної клінічної анатомії
Одеського національного
медичного університету,
д. мед. н., професор

О.Л. Аппельханс

Додаток 9

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Української медичної
стоматологічної академії
д. мед. н., професор В.М. Дворник



2021 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

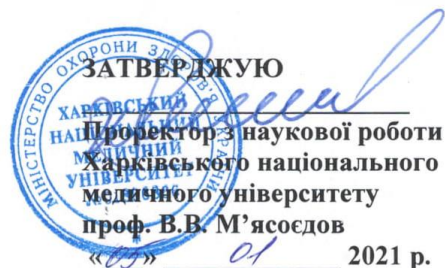
- 1. Найменування пропозиції: (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.)** Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатоμο-експериментальне дослідження).
- 2. Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дудченко Євгеній Сергійович.
- 3. Джерела інформації:**
 - 3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravsky iDV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)
 - 3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020; Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045
 - 3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
- 4. Де і коли введено:** кафедра патологічної анатомії з секційним курсом Української медичної стоматологічної академії, листопад 2020 - січень 2021 року.
- 5. Результати застосування методу.** Отримані результати щодо особливостей регенерації кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії введено у навчальний процес зі здобувачами вищої освіти, лікарями інтернами (в лекційний курс, практичні заняття) та науково-дослідну роботу кафедри.
- 6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3).** Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити й підвищити знання студентів, лікарів-інтернів, аспірантів щодо морфофункціональних особливостей репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії.
- 7. Зауваження та пропозиції:** не поступило.

Пропозиція обговорена та затверджена на кафедральному засіданні протокол № 11 від 29 січня 2021 року.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри
патологічної анатомії з секційним курсом
Української медичної стоматологічної академії
д. мед. н., професор

І.І. Старченко

Додаток 10



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: «Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії».
2. Ким і коли запропонований: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), здобувач – Дудченко Є.С., 2020 р.
3. Джерела інформації: наукові роботи у фахових виданнях України та зарубіжжя:
 - 3.1 Dudchenko YS, Maksymova OS, Pikaliuk VS, Muravskiy DV, Kyptenko LI, Tkach GF. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (Scopus and Web of Science) (IF – 2,052)
 - 3.2 Дудченко ЄС, Ткач ГФ, Муравський ДВ, Максимова ОС, Даниленко МІ. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045
 - 3.3 Дудченко ЄС, Ткач ГФ. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737
4. Де і коли впроваджено: кафедра анатомії людини Харківського національного медичного університету, завідувач кафедри д.мед.н., проф. Вовк О.Ю., вересень – грудень 2020 р.
5. Результати застосування методу в період з 1 вересня 2020 р. по 31 грудня 2020 р.: Впровадження у навчальний процес в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, аспірантами, а також у наукову роботу кафедри.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3): Поглиблення знань студентів, аспірантів щодо морфофункціональних особливостей репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії.
7. Зауваження, пропозиції – немає.

Пропозиція для впровадження обговорена та затверджена на кафедральному засіданні №18 від «29» грудня 2020 р.

Відповідальний за впровадження
 Завідувач кафедри анатомії людини
 Харківського національного
 медичного університету,
 д.мед.н., проф. Вовк О.Ю.

29.12.2020

(дата)

(підпис)

Додаток 11

Список публікацій здобувача

1. Dudchenko Y.S., Maksymova O.S., Pikaliuk V.S., Muravskiy D.V., Kyptenko L.I., Tkach G.F. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (IF – 2,052). (обліковується наукометричними базами Scopus та Web of Science).

2. Ілляшенко В.Ю., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Ткаченко А.С., Дудченко Є.С., Тимошенко О.О., Дейнеко О.С. Спосіб комплексного визначення вмісту макро- і мікроелементів в органах лабораторних щурів у нормі і при патологічних процесах. Патент на корисну модель № 141361. МПК 2020.01. №и 2019 08297; заявл. 2019-07-16; опубл. 2020-04-10, Бюл. № 7).

3. Ілляшенко В.Ю., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Ткаченко А.С., Дудченко Є.С., Муравський Д.В., Дейнеко О.С. Препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент на корисну модель № 145726. МПК 2021.01. № и 2020 05430; заявл. 2020-08-21; опубл. 2020-12-28, Бюл. № 24).

4. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Муравський Д.В., Максимова О.С., Даниленко М.І. Гістологічна структура регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.

5. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737.

6. Дудченко Є.С. Особливості структурної організації регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№4(26):79-85. doi: 10.26693/jmbs05.04.079.

7. Tkach G., Maksymova O., Dudchenko Y., Illiashenko V., Tymoshenko A. The posttraumatic regeneration of long bone diaphysis in animals with chronic hyperglycemia. XXVI International Symposium on Morphological Sciences, Prague, July 5-7 2018. – P. 73-74.

8. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Годовас Д.В., Даниленко М.І. Хімічний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали другої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». м. Дніпро. 10-12 жовтня 2018 року. С. 58-59.

9. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Ілляшенко В.Ю., Максимова О.С. Макро- та мікроелементний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм

хронічної гіперглікемії. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікроелементології» присвяченій пам'яті академіка Ю. І. Кундієва, м.Київ, 4-5 жовтня 2018 року. С. 31-32.

10. Дудченко Є.С., Пастухова К.О., Сухонос О.В., Даниленко М.І., Літовченко Б.М. Особливості макро- та мікроелементного складу тканин скелетном'язової системи задньої кінцівки щурів зрілого віку у нормі. Матеріали II міжнародної науковопрактичної конференції «Сучасні наукові інновації», м. Київ, 24-25 лютого 2018 року (частина I). С. 41-42.

11. Dudchenko Y., Tkach G., Tymoshenko A., Tkachenko A., Maksymova O. Scanning electron microscopy analyses of bone posttraumatic regeneration in animals with chronic hyperglycemia. Матеріали тез доповідей VII конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України, м. Одеса, 2-4 жовтня 2019 року. С. 200.

12. Дудченко Є.С., Сікора В.З., Ткач Г.Ф. Структурні особливості регенерата довгих трубчастих кісток скелета при хронічній гіперглікемії організму та спрямованій остеотропній терапії збагаченої тромбоцитами плазми. Наукова-практична конференція «Актуальні питання сучасної морфології» присвячена 100-річчю з дня народження професора Олександра Гавриловича Яхницьі та 65-річчю з дня народження професора Миколи Анатолійовича Волошина, м. Запоріжжя, 3-4 жовтня 2020 року. С. 55-56