

УДК: 617.58-002.4-003.93-08:616.379-008.64

УКПП

№ держреєстрації 0117U003926

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, Україна, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, тел. (0542) 33 41 08

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
д-р фіз-мат. наук, проф.

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої
кінцівки за умов хронічної гіперглікемії

СТВОРЕННЯ МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ ДЛЯ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ
НАСТАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ І СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ
СТОПИ ТА ПОШУК ШЛЯХІВ КОРЕКЦІЇ ПРОЦЕСУ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИН
ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

(остаточний)

Керівник НДР,
канд. мед. наук, с.н.с.

24.09.2020

О.О. Тимошенко

2020

Рукопис закінчено 18 вересня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою Сумського державного
університету, протокол від 24.09.2020 р. №2

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, к.мед.н., с.н.с кафедри фізіології і патофізіології	24.09.2020	О.О. Тимошенко (розділ 3, висновки)
Відповідальний виконавець: аспірант кафедри морфології	24.09.2020	О.С. Максимова (вступ, розділ 2, висновки)
Аспірант кафедри морфології	24.09.2020	Д.В. Муравський (розділ 1.1, розділ 2)
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	24.09.2020	Я.Д. Чумаченко (розділ 1.1)
Аспірант кафедри морфології	24.09.2020	Є.С. Дудченко (розділ 2)
Фахівець	24.09.2020	Д.В. Годовас (передмова, перелік посилання)
Студентка медичного інституту	24.09.2020	М.І. Даниленко (розділ 1.1)
Студент медичного інституту	24.09.2020	Н.С. Мchedlishvili (розділ 1.1)
Студентка медичного інституту	24.09.2020	В.О. Кір'ян (розділ 1.1)
Студент медичного інституту	24.09.2020	В.М. Удовенко (розділ 3)
Студентка медичного інституту	24.09.2020	Є.А. Гарбузова (розділ 1.1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 56 с., 3 ч., 13 рис., 1 табл., 111 джерел.

ГІПЕРГЛІКЕМІЯ, РЕПАРАТИВНИЙ МІОГЕНЕЗ, РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ, ТРАВМА, PRP.

Об'єкт дослідження – процес регенерації тканин за умов хронічної гіперглікемії.

Мета роботи – встановлення молекулярно-генетичних та морфологічних особливостей регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії

Методи дослідження – біохімічний, морфометричний, мікро- та ультраструктурний аналіз та методи статистичного аналізу.

Результати досліджень показали, що хронічна гіперглікемія організму призводить до затримання ліквідації запалення у місці кісткового дефекту, що робить процес репаративного остеогенезу більш тривалішим. Відбувається порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми коректує негативний вплив хронічної гіперглікемії на процеси репаративного остеогенезу. Швидше настає очищення місця дефекту від запального інфільтрату, формування остеогенних балок, ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини у пластинчасту. Репаративний остеогенез проходить по типу остеобластичного диферону.

Ультрамiкроскопiчним аналізом було виявлено, що негативний вплив хронічної гіперглікемії на процес посттравматичної регенерації скелетних м'язів, характеризувався масивним розвитком елементів сполучної тканини на тлі пригнічення та недосконалого формування нових м'язових волокон. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми у щурів із хронічною гіперглікемією покращує процес м'язового відновлення, зміщуючи його від розвитку сполучнотканинного рубця в бік формування повноцінного м'язового органу.

ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	5
Передмова	6
Вступ	7
1 Огляд літератури	
1.1 Корекція репаративного остео- та міогенезу плазмою збагаченою тромбоцитами	9
2 Морфологічна характеристика стадій репаративного остеогенезу довгих кісток скелета за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм та застосування збагаченої тромбоцитами плазми	19
3 Ультраструктурний аналіз регенерації скелетних м'язів щурів за умов хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми	33
Висновки	44
Перелік джерел посилання	45

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

XГ – хронічна гіперлікемія

ЦД – цукровий діабет

ІМТ – індекс маси тіла

BGLAP – кістковий Gla-протеїн (остеокальцин)

ENPP1 – ектонуклеотид пірофосфатаза/фосфодіестераза 1

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

VEGF-A – судинний ендотеліальний фактор росту А

ЗТП – збагачена тромбоцитами плазма

PRP – плазма багата тромбоцитами

PDGF – фактор росту отриманий тромбоцитами

TGF- β – трансформуючий фактор росту бета

IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту-1

EGF – епідермальний фактор росту

ПЕРЕДМОВА

До числа найтяжчих проявів цукрового діабету відносять порушення регенерації тканин, що відіграє провідну роль у патогенезі синдрому діабетичної стопи. Згідно з даними Міжнародної федерації діабету, понад 50 % пацієнтів з цукровим діабетом (кількість яких на сьогодні у світі перевищує 300 млн осіб) знаходяться у групі ризику розвитку цього небезпечного стану. У майже половини з них хвороба діагностується на пізніх стадіях, що потребує ампутації ураженої кінцівки та збільшує ймовірність летального наслідку у 2 рази. Слід також відмітити, що вартість лікування синдрому діабетичної стопи на запущених стадіях у 3 рази вища, ніж у ранній період.

За даними сучасних клінічних досліджень, своєчасна діагностика із залученням методів молекулярно-генетичного аналізу та своєчасне лікування діабетичної стопи дозволяють знизити ризик ампутації на 43-85 %. Враховуючи нещодавно відкриту роль білка остеокальцину в регуляції метаболізму глюкози шляхом посилення її захоплення міоцитами, впливу на експресію гена інсуліну і проліферацію β -клітин підшлункової залози генетична варіабельність BGLAP, як і ENPP1, білковий продукт якого здатен впливати на чутливість клітин до інсуліну, може стати новим діагностичним маркером та предиктором як цукрового діабету, так і ймовірності розвитку його ускладнень, що пов'язані з порушенням процесів регенерації. Крім того, однією з важливих патогенетичних ланок розвитку діабетичної стопи є порушення васкуляризації в дистальних відділах нижніх кінцівок. Ймовірність такої події можна оцінити шляхом визначення структурних особливостей гена VEGF-A, що кодує судинний фактор росту – основний регулятор неоваскулогенезу.

Поряд з цим вивчення впливу кореторів на процеси посттравматичної регенерації тканин опорно-рухового апарата нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії дозволили більш повно зрозуміти та створити теоретичне підґрунтя для розробки нових ефективних шляхів її покращення.

ВСТУП

Згідно з даними світової статистики травми опорно-рухового апарату займають друге місце серед причин тимчасової непрацездатності, третє місце – серед причин інвалідності та смертності [1]. За прогнозами Diana Lopes та співавторів, у Європі щорічна кількість переломів до 2025 року зросте на 28 % (з 3,5 до 4,5 мільйона випадків) [2].

Сьогодні, за даними ВООЗ, в усьому світі близько 422 мільйони осіб страждають на цукровий діабет (ЦД). У 2045 році експерти прогнозують зростання захворюваності на ЦД до 629 млн, що становить велику соціально-економічну проблему [3, 4]. У структурі травм опорно-рухового апарату в здорових осіб переломи ключиці становлять 17,5 %, плечової кістки – 8,2 %, кісток передпліччя – 60,8 %, стегнової кістки – 8,2 %, кісток гомілки – 5,2 % [5]. Серед хворих на ЦД та в осіб із порушенням толерантності до глюкози переломи кісток передпліччя становлять 21 %, хребців – 18 %, стегнової кістки – 18 %, кісток гомілки – 19 % [6]. Крім того, в пацієнтів із ЦД частка уповільненої консолидації відламків, незрощень, несправжніх суглобів порівняно зі здоровими особами досягає від 8 до 32 % [7].

Останніми роками аутологічні концентрати тромбоцитів широко використовують для регенерації тканин у клінічній практиці [8]. Вже доведено високу ефективність біологічних препаратів на основі збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) в лікуванні спортивних травм, при операціях на суглобах та кістках і в стоматології [9, 10]. Однак відомостей про ефективність та можливість застосування ЗТП при переломах довгих трубчастих кісток та пошкодженнь скелетних м'язів в осіб, які страждають на хронічну гіперглікемію або цукровий діабет II типу, у світовій науковій літературі недостатньо.

Отже, незадовільні наслідки порушень регенерації кісток та скелетних м'язів 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 osteo- та міогенезу за умов хронічної гіперглікемії організму та нових ефективних, економічно більш доступних підходів до їх лікування.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Корекція репаративного osteo- та міогенезу плазмою збагаченою тромбоцитами

Кісткова тканина 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 osteoіндуктивних матеріалів на процеси регенерації кісткової тканини. 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 або крові донора [11].

Розробка методів клітинної та тканинної технології дозволяють домогтися поєднання таких факторів, як біосумісність (відсутність шкідливого впливу на клітини і тканини пацієнта), біодеградацію (здатність матеріалу до поступового розщеплення і елімінації з організму) і біоактивність (стимуляція репарації і регенерації пошкодженої тканини) [12, 13, 14].

В останні роки аутологічні концентрати тромбоцитів широко використовуються для регенерації тканин у кількох галузях медицини, таких як ортопедія, спортивна медицина, стоматологія та щелепно-лицьова хірургія, офтальмологія, пластична та серцева хірургія [13].

У даного методу є певні переваги: відсутність алергічної реакції, так як використовуються власні тканини пацієнта; запобігання інфікування кров'ю, так як, знову ж таки, 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 є швидкість і простота її отримання. Речовини, що містяться в PRP, є аутогенними, тобто повністю сумісними, і не викликають небажаних реакцій з боку організму пацієнта [15, 16, 17, 18].

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. Дійсний інтерес представляє цілеспрямований вплив на остеогенез. Важлива роль в процесі репарації і регенерації кісткової та інших пошкоджених тканин відводиться тромбоцитам [19].

Тромбоцити - це клітини крові, які не мають ядра і відносяться до цитоплазматичних фрагментів мегакаріоцитів. У цитоплазмі містяться органели та структури, такі як, гранули (трьох видів: α , β і γ). У кожному тромбоциті міститься від 50 до 80 гранул, і кожна гранула покрита унікальною оболонкою. Діаметр α -гранули знаходиться в межах від 200 до 500 нм, вона містить більше 30 активних білків, багато з яких грають важливу роль в зупинці кровотечі і відновлення тканин [20, 21].

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 плазма збагачена тромбоцитами. Її отримують шляхом центрифугування крові пацієнтів, досягаючи збільшення концентрації тромбоцитів. На даний час відомо, що засоби в складі яких міститься плазма збагачена тромбоцитами мають високий рівень ефективності в лікуванні травм опорно-рухового апарату, а також її позитивну дію в стоматології, ревматології та косметології [22].

Плазма, багата тромбоцитами, (PRP) - це продукт, отриманий з аутологічної крові, і її приготування призначене для отримання високої концентрації тромбоцитів у малому об'ємі плазми. Як плазма, так і її препарати містять фактори росту, які відіграють певну роль під час початкової фази загоєння та регенерації кісток [23].

Основними факторами росту, що беруть участь у регенерації кісток, є речовини, які містяться в гранулах тромбоцитів (фактор росту, отриманий

тромбоцитами - PDGF), трансформуючий фактор росту бета - TGF- β , інсуліноподібний фактор росту-1 - IGF-1 та епідермальний фактор росту – EGF [24, 25, 26].

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 в під час ремоделювання кістки. Fibroblast growth factor - 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 1 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 [27].

PRP отримують центрифугуванням аутологічної крові хворих. Результатом цього центрифугування є велика концентрація тромбоцитів у малому об'ємі плазми. Існує багато методів отримання PRP, кожен з яких має специфічні властивості щодо концентрації тромбоцитів і процесу вивільнення певних факторів росту. У зв'язку з тим, що готується вона з власної крові пацієнта і в ній міститься значна кількість цитокінів, які здатні регулювати процеси в першій фазі консолідації, притягуючи в зону перелому імунні клітини, підсилюючи їх адгезію до ендотеліоцитів і не викликають імунологічних реакцій. Крім цього цитокіни беруть участь у перебудові кісткової тканини, стимулюють розвиток запалення, сприяють диференціюванню клітин попередників [22, 23, 29].

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 [30].

В якості живих клітин використовується концентрат власних тромбоцитів пацієнта, які, руйнуючись в кістковому дефекті, виділяють численні фактори росту, які запускають і активізують процеси остеогенезу [31].

Плазма збагачена тромбоцитами (PRP), являє собою концентрат тромбоцитів з аутологічної крові. Фактори росту синтезуються мегакариоцитами і зберігаються в α -гранулах тромбоцитів. Вони відіграють значну роль в регуляції механізмів загоєння і регенерації. Рісткові фактори (GFs), включаючи PDGF (тромбоцитарний фактор росту), VEGF (фактор росту ендотелію судин), FGF (основний фактор росту фібробластів), EGF (епідермальний фактор росту), IGF (інсуліноподібний фактор росту) та TGF- β 1 (трансформуючий фактор росту β 1) вивільняються з альфа-гранул тромбоцитів при їх активації. Відомі тромбоцитарні фактори не тільки покращують набір, проліферацію та диференціювання стовбурових мезенхімальних клітин, але також вважають, що вони беруть участь у ангиогенезі та механізмах запалення [32, 33, 67].

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) [34].

Після пошкодження тканин и розриву кровоносних судин, кров накопичується в утвореному проміжку, утворюючи кров'яний згусток, що складається з тромбоцитів та фібринових волокон, формуючи так звану мережу. Послідовно ця зона перетворюється на біологічну матрицю, куди мігрують і проліферують остеогенні клітини. Через деякий час після утворення гематоми, вона зазнає ретракції. Внаслідок цього тромбоцити здавлюються та активуються, починається дегрануляція α -гранул, які містять в собі фактори росту, що впливають на рецептори мембран остеогенних клітин, стимулюючи їх до диференціації та проліферації, таким чином покращуючи процеси регенерації кісткової тканини [67].

Вище перераховані фактори росту надходять у зону пошкодження при активації (дегрануляції) цих клітин в процесі адгезії або агрегації чи при їх

руйнуванні. Під час активації тромбоцитів велика частина містяться в гранулах біологічно активних речовин виділяється через канальцеву систему з подальшим злиттям мембран гранул з плазматичною мембраною тромбоцита. Для того, щоб активувати тромбоцити та вивільнити а-гранул необхідні певні речовини активатори до яких відносять: міжклітинний кальцій, тромбін, кальцію хлорид, колаген [25].

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 ангиогенез. У здорових людей нормальна кількість тромбоцитів у кров'яному руслі становить приблизно від 180 000 до 320 000 / мкл, тоді як плазма збагачена тромбоцитами (PRP) містить принаймні 1 000 000 тромбоцитів / мкл. Тромбоцити циркулюють в судинному руслі, транспортуючи фактори росту і вивільняючи їх разом з факторами згортання крові в тих ділянках, де тканини були пошкоджені. Життєвий цикл цих клітин триває близько 10 днів, після чого старі тромбоцити руйнуються макрофагами, а на їх місце приходять новоутворені [35, 36, 37, 38].

Підходи до лікування пошкоджень і захворювань опорно-рухового апарату за останні роки значно змінилося. 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 [39, 40].

Бур'янов О.А. та співавтори зазначають, що при використанні аутогенної кісткової тканини та фібрину збагаченому тромбоцитами, в регенерації відмічається хаотичне розміщення кісткових трабекул та їх різна зрілість. На поверхні кісткових трабекул щільність остеоцитів бала нерівномірною,

ззначають автори. Були знайдені ділянки регенерату з високою щільністю цих клітин, а також безклітинні зони. В регенераті проміжки між кістковими балками заповнюють кровоносні судини. В кістковомозковому каналі та на кісткових балках щільно розміщуються остеобласти. Тут же знайдено фіброретикулярну тканину з великою кількістю клітин фібробластичного диферону. В зоні перелому формується периост, який складається з колагенових волокон пухкої та щільної консистенції. 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 [41].

Після проведення PRP-терапії відмічається: поліпшення кровообігу в області 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 [42].

Варес Я.Е. та Сліпий В.З. вважають, що збагачена тромбоцитами плазма 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 [43].

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 фібробластиками. У експериментах *in vivo* показано, що введення PRP у зону перелому прискорює формування кісткової тканини. В дослідях на тваринах встановлено, що застосування PRP прискорює остеогенез і ремоделювання [44, 45].

Плазма збагачена тромбоцитами 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 опокращує процеси репаративного osteo- і хондрогенезу, покращуючи результати оперативного лікування хворих із дефектами кісткової та хрящової тканин, зменшує кількість реостеосинтезів у 7 разів і призводить до скорочення термінів непрацездатності на 15 % [46].

На думку Климовицького В. Г. і Соловйова І. А., використання плазми, збагаченої тромбоцитами, в лікуванні ушкоджень кісткової тканин 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 [47].

Плазма збагачена тромбоцитами – це суміш життєздатних та гемостатично активних тромбоцитів у плазмі, які виготовлення методом поетапного центрифугування. Згідно результатів сучасних досліджень, прискорення процесів регенерації відбувається при стимуляційні дії PRP, за умови якщо вона містить концентрацію тромбоцитів не менше 1 млн. клітин [48].

Відомо, що тромбоцити впливають на кісткову тканину 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 [68]. 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 [35, 49, 50, 51].

Аналізуючи велику кількість літератури, відзначаємо, що існує досить широкій спектр назв плазми збагаченої тромбоцитами (PRP). В різних джерелах

можна зустріти такі їх варіанти: «тромбоцитарний концентрат», «тромбоцитарний гель» або «тромбоцитарна суспензія» [52, 53, 54].

У 2009 році David M. Dohan Ehrenfest спробував створити першу класифікацію плазми збагаченої тромбоцитами, 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) [55, 56].

З часом дослідники намагалися удосконалити та розширити класифікацію плазми збагаченої тромбоцитами. У 2011 році A. Mishra розробив структурний розподіл даного препарату, що об'єднує в себе показники концентрації тромбоцитів, фракції лейкоцитів та застосування активаторів [57].

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. Оскільки протеолітичні ферменти нейтрофілів можуть мати згубний вплив на клітини та міжклітинний матрикс у зоні регенерації, і може призвести до зниження ефективності застосування та як наслідок розладів остеогенезу. Відповідно наведеній класифікації, концентрація тромбоцитів може бути низькою (менше 550000 тромбоцитів в 1 мл), помірною (7 50000 тромбоцитів в 1 мл), високою (менше 1800000 тромбоцитів в 1 мл), і надзвичайно високою (суперконцентрація більше 1800000 тромбоцитів в 1 мл) [58].

Велика кількість вітчизняних дослідників застосовують плазму збагачену тромбоцитами 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 [40, 59, 60, 61, 62].

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 [63].

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 ангиогенез та сприяють утворенню м'якої мозолі [65].

Багаточисленні 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. Автологічні кісткові трансплантати в поєднанні з PRP показали позитивні результати у прискоренні регенерації кісток на тваринних моделях [64].

За умови нормального перебігу консолидації перелому, при введенні плазми збагаченої тромбоцитами шляхом ін'єкції менше виражена набряклість у пошкоджених тканинах, менше проявляються ознаки гострого і хронічного запалення, фаза альтерації швидше змінюється регенераторно-репаративними процесами. Використання збагаченої тромбоцитами плазми 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 [69].

Отже, можна сказати, що плазма збагачена тромбоцитами 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 плазми збагаченої тромбоцитами, 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 [68].

Також, одним із перспективних терапевтичних засобів, здатних покращувати регенерацію посмугованих м'язів, є збагачена тромбоцитами плазма. Wright-Carpenter et al. [70] показали, що введення Autologous Conditioned Serum щурам із контузією скелетного м'яза прискорює активацію сателітоцитів та призводить до збільшення розміру регенеруючих волокон. Gigante et al. [71] встановили, що введення в місце ушкодження Platelet Rich Fibrin Matrix покращує регенерацію посмугованих м'язів та сприяє неоваскуляризації. Низкою досліджень також показано, що введення у місце травматичного дефекту PRP зменшує термін регенерації, покращує гістологічні показники та функціональне відновлення скелетних м'язів у щурів [72-75]. Крім цього Namid et al. [66] показали, що ін'єкція PRP здатна пришвидшувати відновлення травмованих скелетних м'язів у спортсменів, а Nitecka-Buchta et al. [77] встановили, що введення PRP у жувальний м'яз зменшує біль у хворих із ураженням скронево-щелепної ділянки. Слід відмітити, що низка систематичних оглядів не змогли зробити кінцевого висновку стосовно ефективності та безпечності застосування PRP під час лікування м'язових травм у людей [78].

На сьогодні показано, що PRP позитивно впливає на процеси відновлення м'яких тканин у хворих із ЦД. Результати мета-аналізів досліджень ефективності застосування PRP для лікування виразок у хворих із синдромом діабетичної стопи показали, що цей метод достовірно покращує загоєння ран та прискорює функціональне відновлення пацієнтів [79-81].

При цьому на сьогодні відсутні роботи щодо вивчення впливу PRP на процес м'язової регенерації за умов ЦД.

2 МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТАДІЙ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ДОВГИХ КІСТОК СКЕЛЕТА ЗА УМОВ ВПЛИВУ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ НА ОРГАНІЗМ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ

Дослідження було проведено на 70 білих лабораторних щурах-самцях зрілого віку 7–9 місяців, поділених на такі групи: I – контрольна для проведення коректного порівняльного аналізу одержаних даних процесу остеорепарації (20 щурів); II – тварини з посттравматичним дефектом великогомілкових кісток за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії (20 щурів); III група – щури з експериментальною хронічною гіперглікемією та введенням у ділянку перелому збагаченої тромбоцитами плазми крові (20 щурів); IV – група для оцінювання стану глюкозного гомеостазу і підтвердження змодельованої хронічної гіперглікемії (10 щурів).

Перед початком експерименту всі тварини були оглянуті на предмет їх рухової активності та стану зовнішнього покриву. Після цього щури підлягали двотижневій карантинізації. Піддослідних тварин доглядали відповідно до загальноприйнятих рекомендацій, вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами («Правила проведення робіт із використанням експериментальних тварин», додаток 4, затверджений Наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1997 р.; «Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин»; «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.); Гельсінська декларація Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000 р.); Положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985)). Під час проведення дослідних робіт норми етики і моралі не були порушені. Щури перебували в кімнаті віварію за умов сталої температури (24–

25 °C), вологості (60 ± 5) % та умов 12-годинного циклу зміни темряви й освітлення. Поточне прибирання кліток виконували щоденно.

Тваринам II, III та IV груп моделювали хронічну гіперглікемію (ХГ) таким чином: упродовж 2 тижнів замість питної води щури вживали 10 % водний розчин фруктози. Після цього кожному щуру одноразово було виконане внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину (Streptozocin «Sigma-Aldrich») (40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг). Щурам I (контрольної) групи була зроблена одноразова внутрішньоочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буфера. Після введення стрептозотоцину тварини перебували у звичайних умовах віварію на звичайному харчовому та питному раціоні впродовж 60 діб.

На 60-ту добу після відтворення моделі (ХГ) у тварин IV групи в плазмі крові визначали показники вмісту глюкози натще, інсуліну та С-пептиду, на основі яких підтверджували наявність гіперглікемії організму (табл. 1).

Щурам I, II та III груп був змодельований дірчастий дефект обох великогомілкових кісток із метою можливого подальшого дослідження репаративного остеогенезу на мікро- та ультраструктурному рівнях. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах під кетаміновим наркозом. За 30 хвилин до початку операції тваринам внутрішньом'язово вводили профілактичну дозу ампіциліну (7,5 мг/кг), ксилазин (3 мг/кг) та кетамін (8 мг/кг). Передопераційну підготовку операційного поля проводили шляхом виголювання шерстяного покриву в ділянці передньої поверхні гомілок і тричі обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. Робили розрізи завдовжки 0,8–1,5 см по лінії *margo anterior tibiae*. За допомогою портативної зуботехнічної бормашини стерильним бором (d 1,6 мм) при малих обертах з охолодженням у середній третині діафіза великогомілкових кісток формували отвір до кістковомозкового каналу. Операційні рани закривали шкірним швом, який обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. Впродовж наступних 3 діб після операції для профілактики гнійних ускладнень післяопераційний шов обробляли 3 % спиртовим розчином йоду, а для знеболювання внутрішньом'язово вводили кеторолак дозою 0,2 мг двічі на добу. У тварин I та II груп кістковий дефект залишали загоюватися під

кров'яним згустком. Тваринам III групи з метою можливої корекції негативного впливу ХГ організму на процеси репаративного остеогенезу перед накладанням шкiрного шва у рану було введено збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) кровi (доза – 0,5 мл). З цiєю метою попередньо у тварин з латеральної хвостової вени проводили забiр 2 мл кровi у вакутайнери об'ємом 4 мл, що мiстили 0,35 мл 10 % розчину натрiю цитрату. Втрачений об'єм кровi негайно вiдновлювали iнфузiєю стерильного фiзiологiчного розчину. Вiдiбрану кров центрифугували впродовж 20 хв зi швидкiстю 2 000 об/хв. У результатi в пробiрцi спостерiгалися двi фракцiї компонентiв кровi: нижня фракцiя темно-червоного кольору (клiтиннi компоненти) та верхня фракцiя солом'яно-жовтого кольору (компоненти сироватки). Пiсля цього пiпетували весь вiст верхньої фракцiї та верхньої частини нижньої фракцiї i переносили iх в iншу пробiрку. Отриманий матерiал центрифугували впродовж 15 хв зi швидкiстю 2 000 об/хв, що призводило до утворення двох фракцiй: нижньої – збагаченої тромбоцитами плазми, верхньої – збiдненої на тромбоцити плазми. Вiст нижньої фракцiї переносили в стерильну пробiрку та доводили об'єм до 1 мл за допомогою 10 % розчину кальцiю хлориду [97]. Отриманий розчин вводили тваринам у рани. З експерименту тварин виводили шляхом передозування тiопенталового наркозу (4мг/100 г маси тiла) на 14-ту та 30-ту доби пiсля завдання травми, тому що цi стадiї процесу загоєння кiсток пiсля перелому вiдповiдають пролiферацiї та диференцiацiї клiтин, утворенню кiсткової тканини та адаптацiйнiй перебудовi новоутвореної кiстки.

З метою вивчення мiкроскопiчної будови вiдпрепарованi дiлянки лiвих великогомiлкових кiсток з дефектом фiксували в 10 % розчинi формалiну, потiм проводили демiнералiзацiю в 5 % водному розчинi Трилону Б. Далi зразки зневоднювали в спиртах зростаючої концентрацiї та проводили заливання в парафiн. Потiм з отриманих препаратiв робили зрiзи на санному мiкротомi МС-2 товщиною 4–6 мкм. Фарбування проводили гематоксилiн-еозином, свiтлову мiкроскопiю – з використанням мiкроскопа Olympus BH-2 (Японiя). Морфометричний аналіз здiйснювали за допомогою мiкросiтки, мiкролiнiйки та з використанням обчислювальної програми «Digimizer». Вимiрювали такi

параметри: площу запального інфільтрату (мм^2), площу грануляційної тканини (мм^2), площу сполучної тканини (мм^2), площу грубоволокнистої кісткової тканини (мм^2), площу хрящової тканини (мм^2).

Для ультрамікроскопічного вивчення з використанням растрової електронної мікроскопії травмовані праві великогомілкові кістки щурів видаляли та фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіду на 0,2 М какодилатному буфері з $\text{pH} = 7,2$ за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$ і постфіксували в 1 % розчині OsO_4 впродовж 4 годин за температури $+4\text{ }^\circ\text{C}$, 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 «PEM 102» та фотографували.

Статистичне оброблення всіх одержаних числових даних проводили з використанням електронного пакета програм SPSS-17. Перевірку величин на нормальність розподілу реалізовували із застосуванням критерію Колмогорова – Смирнова. Дані наведені у вигляді середньої арифметичної (M) та середнього квадратичного відхилення (SD). Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили з використанням параметричного критерію Стьюдента (t). Відмінність вважали достовірною, якщо ймовірність випадкової різниці (P) не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$).

Результати біохімічного аналізу крові щурів контрольної групи та тварин зі стрептозотоцин-індукованою гіперглікемією представлено у таблиці 1. Показано, що в останніх був значно вищим вміст глюкози натще ($P < 0,001$) та зменшений вміст інсуліну ($P = 0,005$). Концентрація С-пептиду між групами не відрізнялась ($P = 0,267$). Також у крові щурів із ХГ був підвищений уміст загального холестеролу ($P < 0,001$), тригліцеридів ($P < 0,001$), ЛПНЩ ($P < 0,001$) та зменшена концентрація ЛПВЩ ($P = 0,004$).

Таблиця 1 – Показники біохімічного аналізу крові щурів контрольної та дослідної груп

Показник	Контроль (n = 10)	ХГ (n = 10)	P
Глюкоза натще, ммоль/л	4,97 ± 0,73	14,76 ± 1,87	< 0,001
Холестерол, ммоль/л	1,89 ± 0,21	3,26 ± 0,36	< 0,001
Тригліцериди, ммоль/л	0,54 ± 0,11	1,03 ± 0,16	< 0,001
ЛПНЩ, ммоль/л	0,59 ± 0,08	0,93 ± 0,12	< 0,001
ЛПВЩ, ммоль/л	1,92 ± 0,20	1,48 ± 0,21	0,004
Інсулін, мкМО/мл	16,01 ± 1,81	12,35 ± 1,77	0,005
С-пептид, нг/мл	3,47 ± 0,79	3,96 ± 0,64	0,267

Примітка: результати представлені у вигляді $M \pm SD$; ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності; ХГ – хронічна гіперглікемія; ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності; n – кількість тварин.

Під час гістологічного та ультраскопічного досліджень на 14-ту добу репаративного остеогенезу в контрольній групі були виявлені кісткові балки з чітко відмежованими молодими лакунами, фіброретикулярна тканина з високою щільністю клітин фібробластичного та остеобластичного диферонів (рис. 2.1 А). На електронних сканограмах на поверхні остеогенних балок простежувалася велика кількість остеобластів, які мали кулясту та кубічну форми, довгі й тонкі відростки. В більшості трабекул добре візуалізовувалося замурування остеобластів у власний матрикс (рис. 2.1 D).

У тварин із ХГ організму ділянка дефекту була заповнена сполучною тканиною і не відбулося повного очищення рани від залишків запального інфільтрату. В центральній частині дефекту спостерігалися локальні скупчення нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів, лімфоцитів та жирових клітин (рис. 2.1 В). Серед клітинного інфільтрату та колагенових волокон виявлялися розсіяні групи хондрогенних клітин. На електронних сканограмах кісткового регенерату були виявлені скупчення клітин округлої форми з численними

тонкими відростками. У проміжках між конгломератами клітин містилися поодинокі деформовані еритроцити й тонкі волокна (рис. 2.1 Е).

У тварин із ХГ, яким після завдання дефекту великогомілкової кістки вводили в рану ЗТП, відзначались упорядкування й трансформація сполучної тканини в остеїдні балки. Найінтенсивніше цей процес відбувався біля материнської кістки. У центрі дефекту була зона сполучної тканини з великою кількістю капілярів синусоїдного типу без ознак утворення кісткових балок (рис. 2.1 С). На електронних сканограмах поверхні регенерату спостерігались остеобласти з тонкими довгими відростками в оточенні аморфного матриксу (рис. 2.1 F).

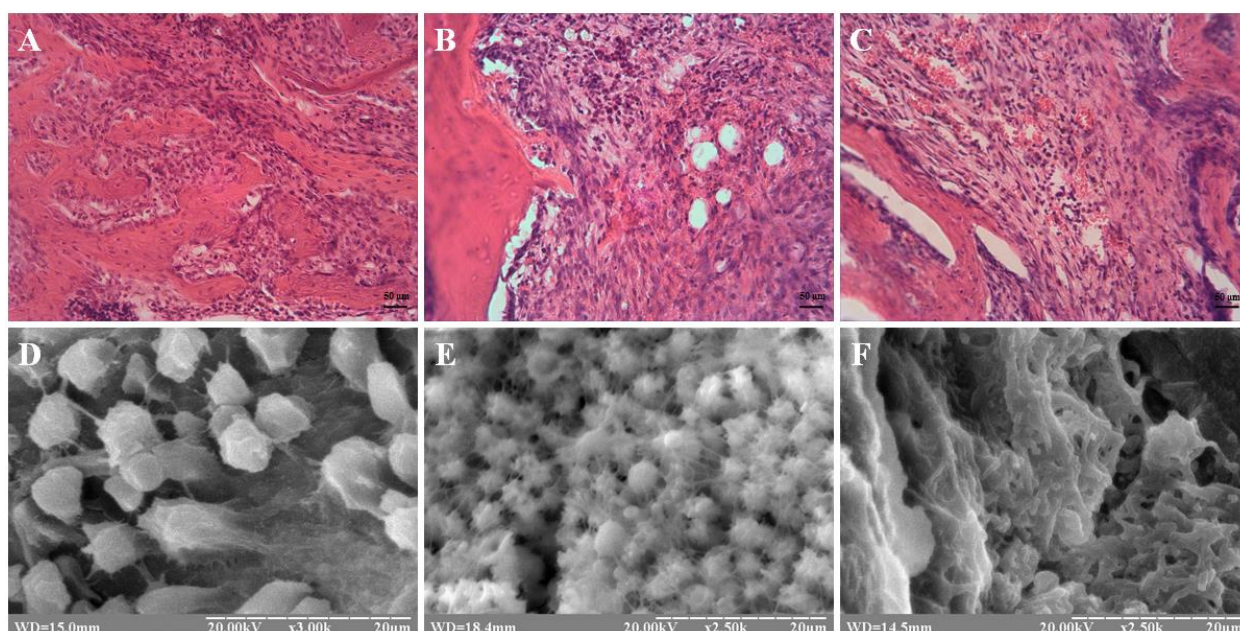


Рисунок 2.1 – А, D – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 14-ту добу репаративного остеогенезу. В, Е – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура зі змодельованою хронічною гіперглікемією на 14-ту добу репаративного остеогенезу. С, F – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура зі змодельованою хронічною гіперглікемією та застосуванням ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенезу. А, В, С – забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 200$. D, E, F – електронні сканограми

На рисунку 2.2 наведений тканинспецифічний склад структур регенерату в дефектах кісток досліджуваних груп на 14-ту добу експерименту. У контрольній

групі тварин посттравматична ділянка складалася зі сполучної тканини на $(55,44 \pm 1,82) \%$ від усієї площі та грубоволокнистої кісткової тканини на $(44,57 \pm 1,61) \%$. У щурів із ХГ зберігалися залишкові ознаки запалення, спричиненого ушкодженням. Запальна клітинна інфільтрація займала $(8,37 \pm 0,86) \%$ від усієї зони остеорепарації, а площа грануляційної тканини – $(9,99 \pm 0,701) \%$. На відміну від контрольних тварин у цій групі утворення грубоволокнистої кісткової тканини на 14-ту добу не відбулося. Натомість були виявлені островці хрящової тканини, що займали $(7,96 \pm 2,51) \%$ від усієї площі регенерату. Всю іншу площу регенерату становила сполучна тканина – $(73,68 \pm 2,25) \%$. У групі тварин із ХГ, якій вводили в рану ЗТП, місце дефекту було заповнене сполучною тканиною на $(68,94 \pm 1,61) \%$ та дрібнопетлястими кістковими трабекулами на $(31,06 \pm 1,61) \%$. Залишкових ознак запалення, грануляційної та хрящової тканин у цій групі в утвореному регенераті не було виявлено.

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 грубоволокнистої кісткової тканини у пластинчасту. Навколо кісткових балок спостерігались активні остеокласти. 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 грубоволокнистою кістковою тканиною (рис. 2.3 А). При скануванні ділянки дефекту його поверхня була покрита новоутвореною кісткою, пронизана численними транскортикальними судинними отворами та остеобластними лакунами (рис. 2.3 D).

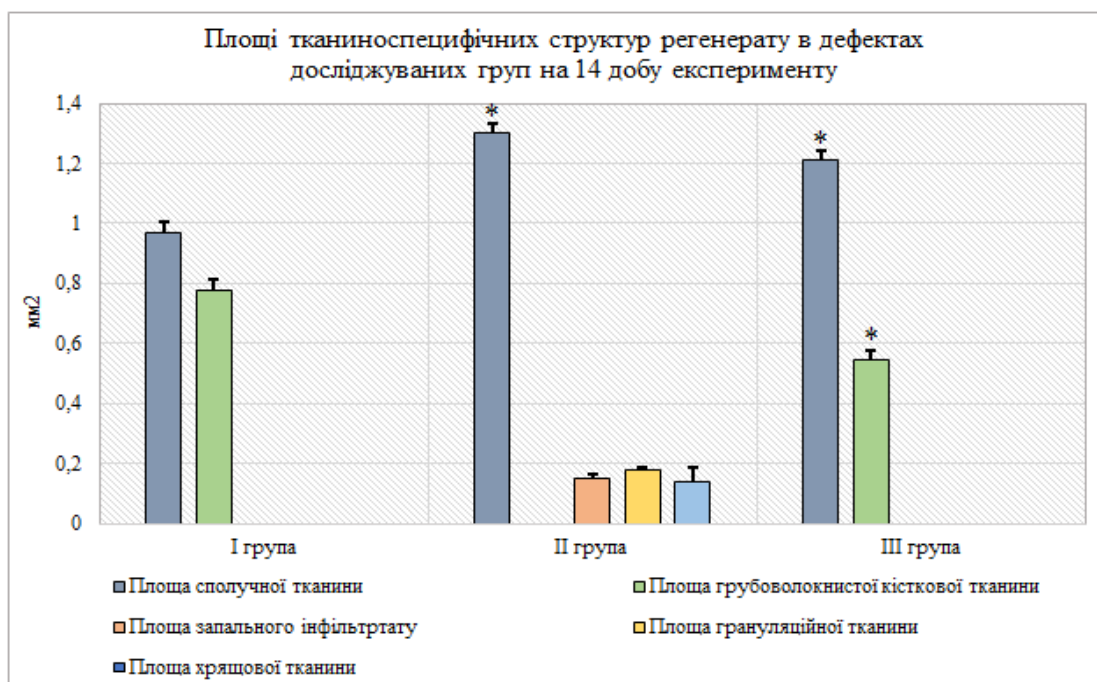


Рисунок 2.2 – Площі тканинспецифічних структур регенерату великогомілкових кісток щурів на 14-ту добу експерименту: I група – контрольна група тварин; II група – тварини з хронічною гіперглікемією організму; III група – тварини, яким після завдання дефекту великогомілкової кістки вводили в рану збагачену тромбоцитами плазму; * – статистично значуща достовірність відмінності між групами порівняння (між I та II групами, між I і III групами)

У групі щурів із ХГ відбувалось утворення остеогенних балок, різних за розмірами, широкими 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 грубоволокнистої сполучної тканини (рис. 2.3 В). Формування пластинчастої кістки в цій групі спостереження не відбулося. 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. 2.3 Е).

У тварин, яким вводили ЗТП, більша половина дефекту великогомілкової кістки була заповнена грубоволокнистою кістковою тканиною. Лише біля материнської кістки спостерігалися початкові вогнища формування пластинчастої кістки з відновленими остеонами з системою Гаверсових каналів (рис. 2.3 С). Під час сканування дефекту центральна ділянка його поверхні була утворена масивними колагеновими тяжами. Біля материнської кістки спостерігались остеобласти, занурені в остеїдний матрикс кісткових балок. У центральній зоні заповнення дефекту відбулося за рахунок грубоволокнистої кісткової та сполучної тканини. Формування окістя у даній групі на 30-ту добу лише починалось формуватись (рис. 2.3 F).

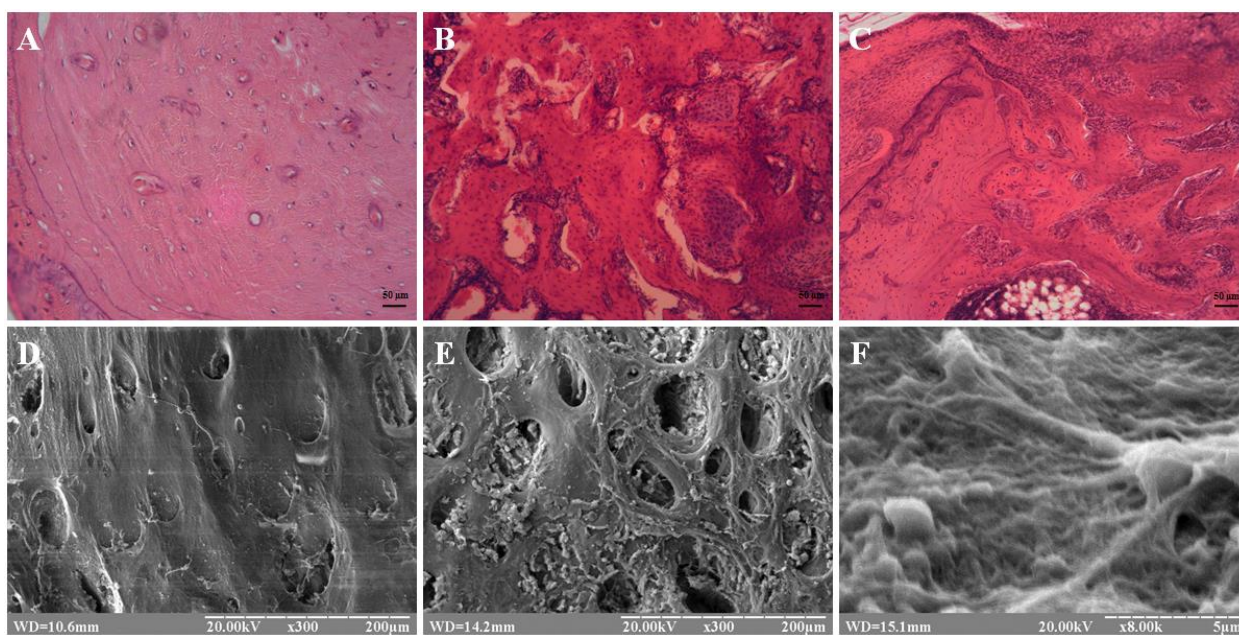


Рисунок 2.3 – А, D – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу репаративного остеогенезу: В, Е – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура зі змодельованою хронічною гіперглікемією на 30-ту добу репаративного остеогенезу. С, F – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура зі змодельованою хронічною гіперглікемією та застосування ЗТП на 30-ту добу репаративного остеогенезу. А, В, С – забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 200$. D, E, F – електронні сканограми

На рисунку 2.4 поданий тканинспецифічний склад структур регенерату в дефектах кісток досліджуваних груп на 30-ту добу експерименту. У контрольній групі тварин ділянка дефекту була заповнена новоутвореною грубоволокнистою та пластинчастою кістковою тканиною, площа якої становила $(84,44 \pm 1,03) \%$ від усієї площі регенерату. У групі тварин, яким вводили ЗТП, утворення пластинчастої кістки лише починалося. Дефект був заповнений на $(72,03 \pm 1,56) \%$ грубоволокнистою кісткою та на $(27,97 \pm 1,56) \%$ – сполучною тканиною. У щурів із хронічною гіперглікемією організму дефект був заповнений трабекулярною кісткою на $(61,54 \pm 2,01) \%$, сполучною тканиною – на $(28,22 \pm 1,42) \%$, та хрящовою тканиною – на $(10,24 \pm 3,37) \%$.

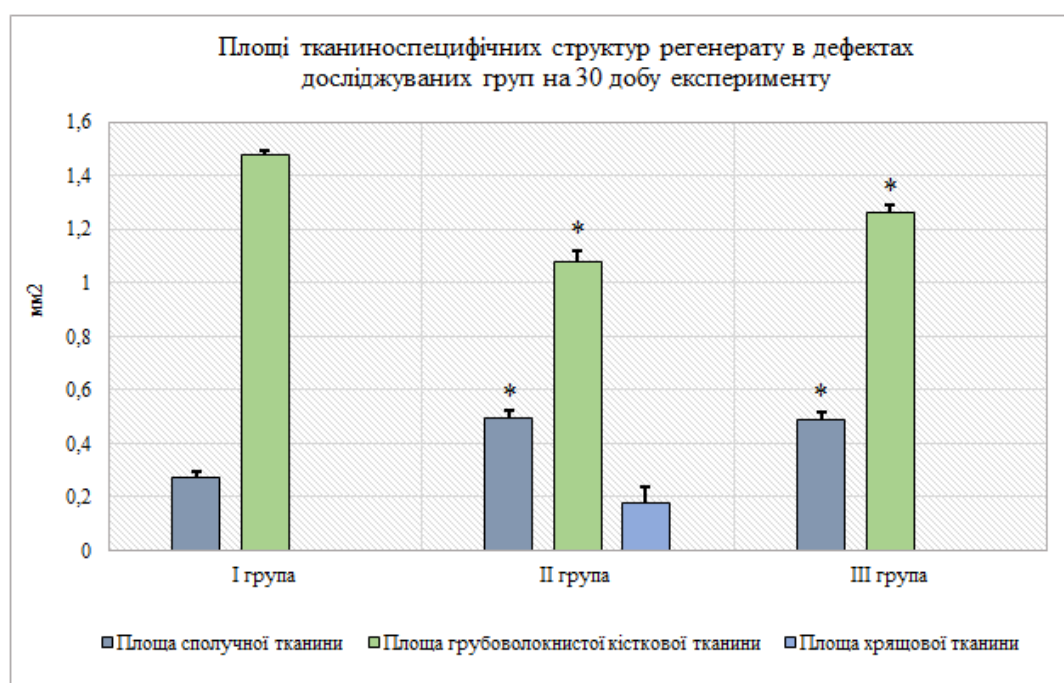


Рисунок 2.4 – Площі тканинспецифічних структур регенерату в дефектах досліджуваних груп на 30-ту добу експерименту: I група – контрольна група тварин; II група – тварини з хронічною гіперглікемією організму; III група – тварини, яким після завдання дефекту великогомілкової кістки вводили в рану, збагачену тромбоцитами плазму; * – статистично значуща достовірність відмінності між групами порівняння (між I та II групами, між I і III групами). ** – площа кісткової тканини (для I та III групи – грубоволокнистої та пластинчастої кісткової тканини; для II групи – грубоволокнистої кісткової тканини)

Отже, 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 [82-86].

A. Sadighi, M. L. Brown та співавтори повідомляють про високий відсоток (від 8 до 32 %) порушень процесів репаративного остеогенезу в умовах цукрового діабету 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 [87-90]. У нашому дослідженні ми виявили, що в групі тварин із ХГ організму відбувається порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату.

На думку Carlos Marin та співавторів, при ХГ організму порушується узгоджена дія сигнальних молекул та регуляторів транскрипції репаративного остеогенезу, що призводить до зниження функціонування остеобластів, збільшення кількості жирової тканини в складі регенерату та істотного гальмування процесу консолідації переломів [91-92]. Під час аналізу стадій процесу остеорепарації ми виявили затримання ліквідації першої фази запалення у тварин із ХГ організму, як наслідок, на 14-ту добу регенерат у цій групі містив жирові клітини та ділянки локальної лімфоцитарно-лейкоцитарної інфільтрації.

Важливу роль у загоєнні кістки при цукровому діабеті 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 [93]. У нашому дослідженні ми виявили порушення структурування колагену в остеодні балки у тварин із ХГ організму 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 відзначалися 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 перевищує показник у контрольних тварин, що свідчить про ускладнення процесів репаративного остеогенезу [94]. За допомогою аналізу морфометричних показників у нашому дослідженні виявлено: що у тварин, в яких рівень глюкози перевищував нормальні показники, на 14-ту добу репаративного остеогенезу площа сполучної тканини була вищою на 18,24 % ($p < 0,001$), а на 30-ту добу – на 12,66 % ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи.

Отже, у тварин із ХГ організму 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 [91, 95]. Наше дослідження підтверджує, що у тварин із ХГ організму процес репаративного остеогенезу більш тривалий, що обумовлюється затриманням переходу від однієї стадії до іншої. Лише на 30-ту добу процесу остеорепації новоутворена

грубоволокниста кісткова тканина становила ($61,54 \pm 2,01$) % від усієї площі регенерату, що на 22,89 % ($p < 0,001$) менше від контрольного показника.

У групі тварин із ХГ організму, яким після завдання дефекту великогомілкової кістки вводили в рану ЗТП, на 14-ту добу остеогенезу регенерат складався із сполучної тканини на ($68,94 \pm 1,61$) %, що на 4,74 % ($p < 0,001$) менше від тварин із ХГ організму, та грубоволокнистої кісткової тканини на ($31,06 \pm 1,61$) %, що на 13,51 % ($p < 0,001$) менше від показника контрольної групи. Залишкових ознак запалення, грануляційної та хрящової тканини в цій групі в утвореному регенераті на відміну від тварин, яким не вводили ЗТП, не було виявлено. На 30-ту добу площа грубоволокнистої кісткової тканини у регенераті була меншою від контрольної групи на 12,41 % ($p < 0,001$). 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 [69].

Одержані вищезазначені дані свідчать про ще одну дуже важливу здатність ЗТП – антимікробну активність, що також показано й у дослідженнях Т. М. Bielecki і співавт. [96], 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.

За даними О. А. Бур'янова та співавторів, при використанні аутогенної кісткової тканини та фібрину, збагаченого тромбоцитами, в регенераті відзначаються хаотичне розміщення кісткових трабекул та їх різна зрілість, нерівномірна щільність остеоцитів на поверхні кісткових трабекул, формування

періосту, який складається з колагенових волокон пухкої та щільної консистенції. Кісткова тканина, що є регенератом, має певні відмінності від материнської: високу щільність остеоцитів, які мають базофільні ядра з цитоплазмою невеликого об'єму. Ці клітини розміщені в лакунах, що свідчить про відсутність остеоцитарного остеолізису [41]. У нашому дослідженні тваринам, яким вводили ЗТП, дефект великогомілкової кістки був заповнений упорядкованою грубоволокнистою кістковою тканиною, а біля материнської кістки – пластинчастою кісткою з повноцінними остеонами.

Наведені результати представлені у публікації авторів: Dudchenko Ye, Maksymova O, Pikaliuk V, Muravskyi D, Kyptenko L, Tkach G. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. *Analytical Cellular Pathology*, 2020; 2020, ID 5472841 [110].

3 УЛЬТРАСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ РЕГЕНЕРАЦІЇ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ

У дослідженні було використано 130 лабораторних білих щурів-самців зрілого віку (7-9 місяців), яких поділили на чотири групи: I – контрольна група (40 щурів); II – тварини зі змодельованою ХГ (40 щурів); III – щури з експериментальною ХГ та введенням у ділянку пошкодження м'яза PRP (40 щурів); IV – група контролю гіперглікемії (10 щурів).

Тварини доглядалися 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.); 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). Під час проведення експериментальних робіт норми етики і моралі порушені не були. Щури знаходились у кімнаті віварію за умов сталої температури (24-25 °С), вологості (60 ± 5%) та за умов 12-годинного циклу зміни темряви та освітлення. Поточне прибирання кліток виконували щоденно.

Моделювання ХГ у тварин II, III та IV груп проводили вище описаним способом. Тварини групи контролю гіперглікемії слугували для оцінки стану глюкозного гомеостазу та підтвердження наявності гіперглікемії. Для цього на 60 добу після відтворення моделі визначали показники вмісту глюкози натще, інсуліну та С-пептиду в плазмі крові тварин. Також у рамках біохімічного аналізу крові визначали у щурів показники ліпідного обміну.

Після 60-и діб від відтворення ХГ щурам I, II і III груп була змодельована механічна травма триголового м'яза литки. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах під кетаміновим наркозом. За 30 хвилин до початку операції тваринам внутрішньом'язово вводили ксилазин (3 мг/кг) та кетамін (8 мг/кг). Травму відтворювали шляхом лінійного глибокого розрізу перпендикулярно ходу м'язових волокон з подальшим зіставленням та зшиванням країв рани.

Тваринам III групи з метою можливої корекції негативного впливу ХГ на процеси регенерації м'язів перед накладанням шва у рану було введено збагачену тромбоцитами плазму (PRP) крові (доза – 200 мкл). Із цією метою попередньо у тварин із латеральної хвостової вени проводили забір 0,9 мл крові у вакутайнери, що містили розчин натрію цитрату. Втрачений об'єм крові негайно відновлювали інфузією стерильного фізіологічного розчину. Відібрану кров центрифугували впродовж 20 хв зі швидкістю 2 000 об/хв. У результаті в пробірці спостерігалися дві фракції компонентів крові: нижня фракція темно-червоного кольору (клітинні компоненти) та верхня фракція солом'яно-жовтого кольору (компоненти сироватки). Після цього піпетували весь вміст верхньої фракції та верхньої частини нижньої фракції і переносили їх в іншу пробірку. Отриманий матеріал центрифугували впродовж 15 хв зі швидкістю 2 000 об/хв, що призводило до утворення двох фракцій: нижньої – збагаченої тромбоцитами плазми, верхньої – збідненої на тромбоцити плазми. Вміст нижньої фракції переносили в стерильну пробірку та доводили об'єм до 0,5 мл за допомогою 10 % розчину кальцію хлориду. Отриманий розчин вводили тваринам у ділянку травмованого м'язу.

Вивчення морфологічних особливостей регенерації скелетних м'язів проводили на 3, 14 та 28 добу після нанесення механічної травми. Тварин із експерименту виводили по 10 істот з групи у кожний термін шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг/100 г маси тіла).

Ультрамікроскопічне дослідження реалізовували за допомогою електронного мікроскопу ПЕМ-100м (Суми, Україна) з напругою прискорення 75-100 кВ та з використанням трансмісійного електронного мікроскопа (JEM-1230, JEOL, Japan).

Статистичне опрацювання проводили із використанням пакету програм SPSS (версія 17.0, США). Величини на нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили із використанням двостороннього t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущим.

Морфологічний аналіз за допомогою електронної мікроскопії показав, що у щурів контрольної групи на 3 добу після нанесення травми місце дефекту було інфільтровано еритроцитами, нитками фібрину, нейтрофільними гранулоцитами, тканинними базофілами та макрофагами (рис. 3.1). Макрофаги характеризувалися вираженою фагоцитарною активністю з переважанням у цитоплазмі фагосом і лізосом. Еритроцити знаходилися на різних стадіях руйнування.

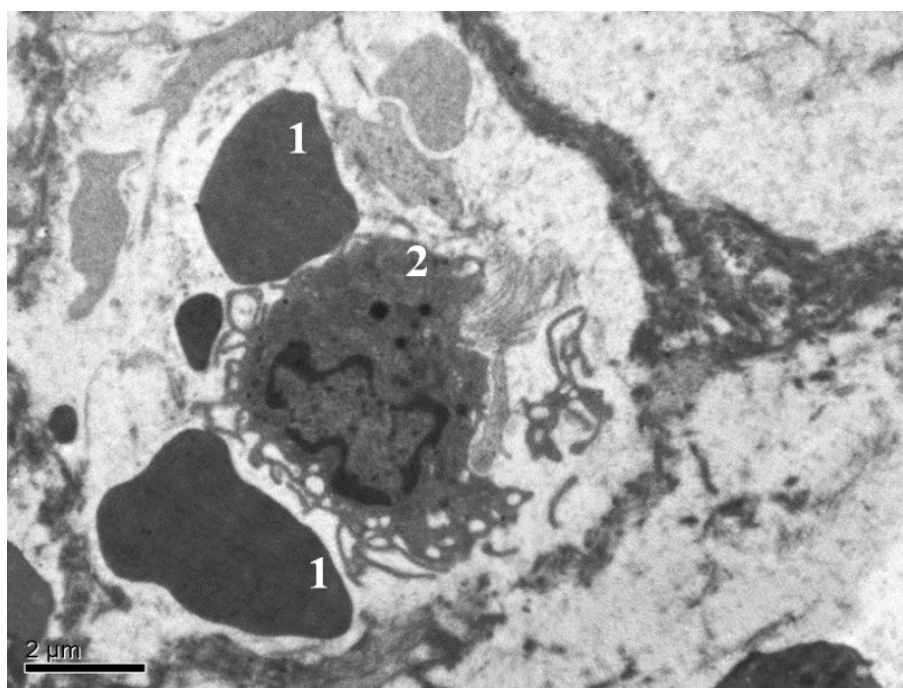


Рисунок 3.1 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура контрольної групи на 3 добу після нанесення травми. Еритроцити в центральній зоні дефекту (1), макрофаг (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. X6200

На 14 добу експерименту місце дефекту було заповнено міогенними клітинами різної форми, що розміщувались серед фібробластів та пучків колагенових волокон (рис. 3.2). Міоїдні клітини мали великі розміри, одне, інколи декілька ядер та пучки міофіламентів, що розташовувались по усьому об'єму саркоплазми. Між міофіламентами знаходилися невеликі за розмірами електронно світлі мітохондрії. У ядрі переважав еухроматин. Плазмолема мала чіткі контури.

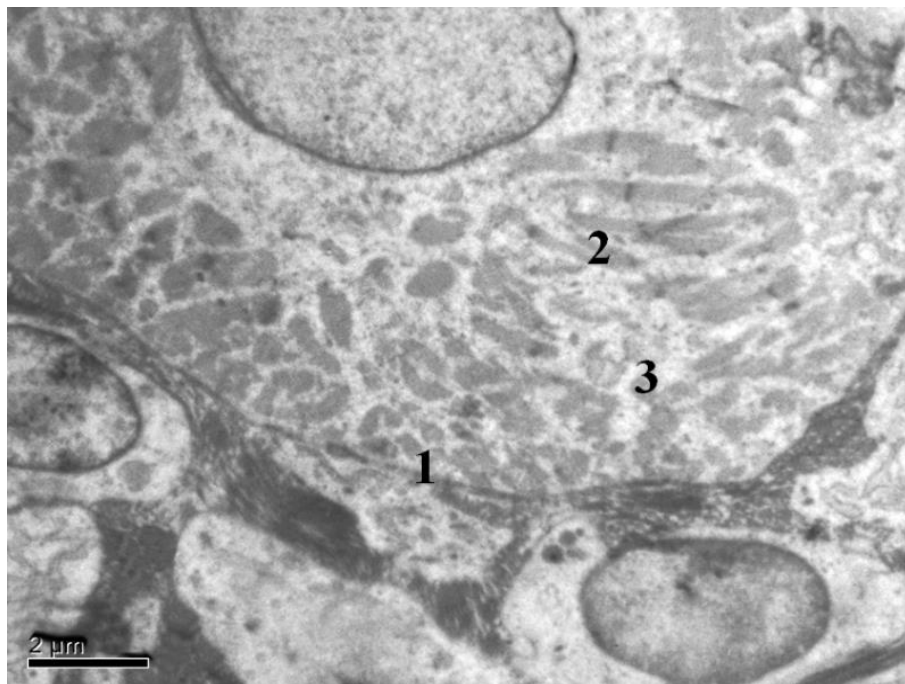


Рисунок 3.2 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура контрольної групи на 14 добу після нанесення травми. Міогена клітина (1), міофіламенти (2), мітохондрії (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. X6200

На 28 добу дослідження після нанесення травми, місце дефекту у групі контролю було заповнено сполучнотканинно-м'язовим регенератом з переважанням сполучної тканини (рис. 3.3). Частіше за все подальший розвиток міогенних клітин у міосимпласти не відбувався через інтенсивний синтез сполучної тканини навколо м'язових волокон клітини. Поряд із цим, у сформованих міосимпластах відзначалась саркомерна організація, чітко візуалізувались Z-лінії, спостерігались різноманітність та злиття мітохондрій.

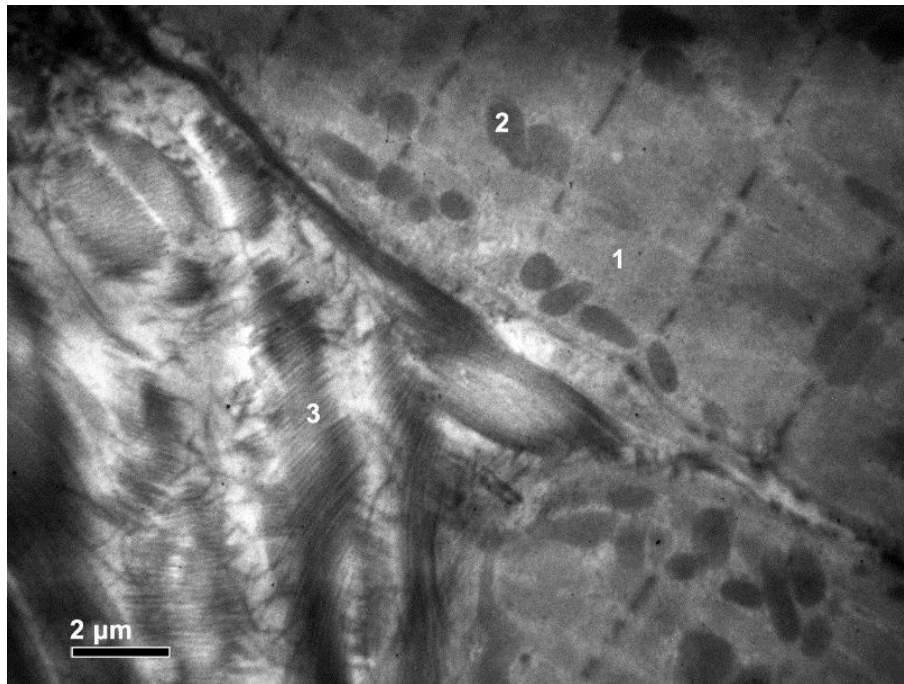


Рисунок 3.3 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура контрольної групи на 28 добу після нанесення травми. Саркомер (1), мітохондрія (2), колагенові волокна (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом.

Зб. X6200

На 3 добу після нанесення травми у тварин із ХГ місце дефекту було заповнено запальним детритом з великою кількістю нейтрофільних гранулоцитів, еозинофілів, базофілів та жирових клітин. Агранулоцитарні лейкоцити в цей термін не зустрічались. Біля країв рани відзначалися некротизовані м'язові волокна. Сегментоядерні нейтрофіли мали велику кількість електронно-щільних аутофаголізосом та електронно-прозорих вакуоль (рис. 3.4).

На 14 добу після травмування триголового м'яза литки тварин дослідної групи в місці дефекту відзначалась висока синтетична активність фібробластів. Клітини характеризувалися дуже розвиненою гранулярною ендоплазматичною сіткою з дилатованими цистернами, заповненими електронно-прозорим вмістом, значно гіпертрофованими мітохондріями з розширеними кристами (рис. 3.5).

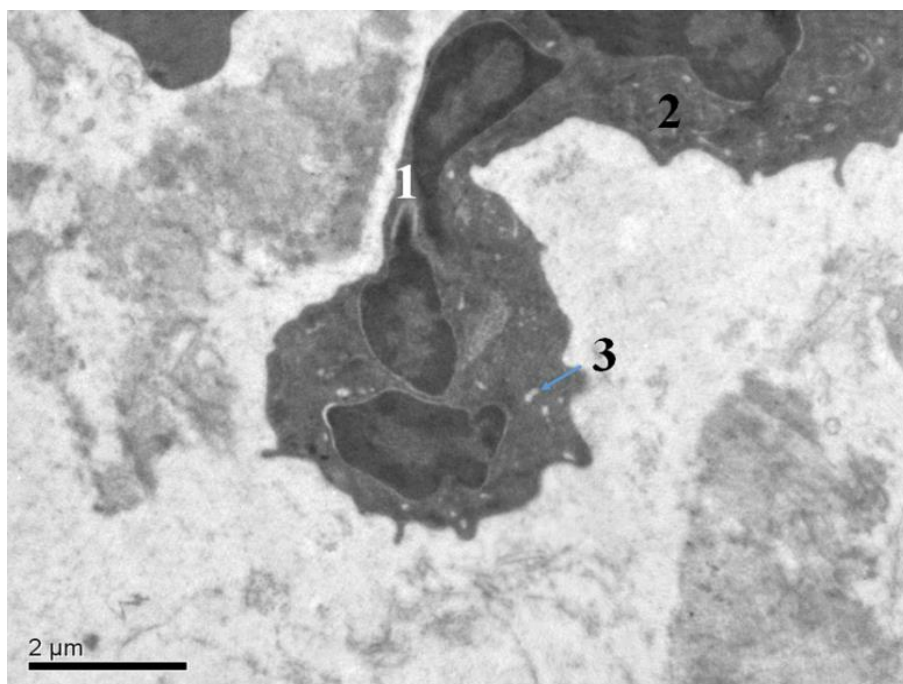


Рисунок 3.4 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура із ХГ на 3 добу після нанесення травми. Нейтрофільний гранулоцит (1), електронно-щільні аутофаголізосоми (2), вакуолі (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. Х6200.

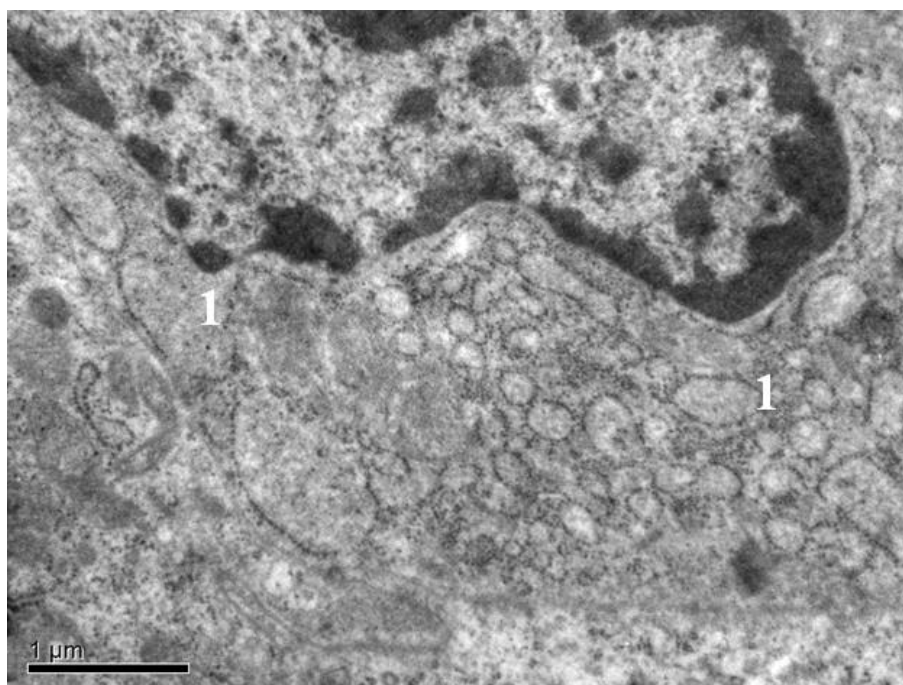


Рисунок 3.5 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура дослідної групи на 14 добу після нанесення травми. Фібробласт. Дилатовані цистерни гЕПР (1). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. Х8000.

На 28 добу після нанесення травми у дослідній групі простежувались слабкі ознаки посттравматичного міогістогенезу. Такі м'язові волокна були значно зменшеними та деформованими (рис. 3.6). У саркоплазмі відзначались поліморфні ядра з численними інвагінаціями, дезорганізовані саркомери з розірваними Z-лініями. Крім того, міосимпласти були оточені значним шаром сполучної тканини, що проникала усередину м'язових волокон.

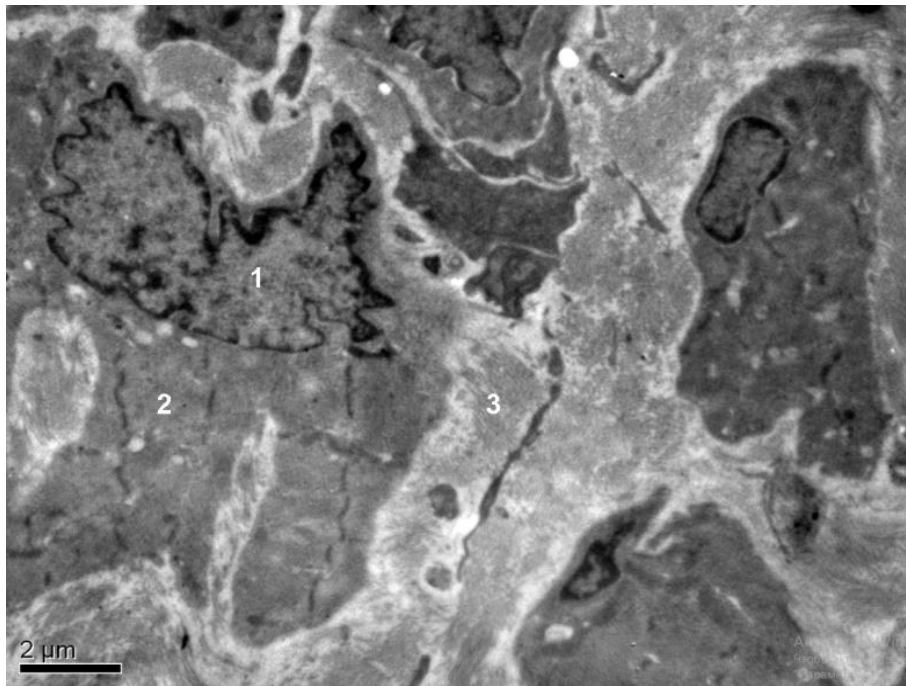


Рисунок 3.6 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура дослідної групи на 28 добу після нанесення травми. Ядро міосателітоцита (1), дезорганізовані саркомери (2), сполучна тканина (3). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. Х4500

На 3 добу після травмування триголового м'яза литки щурів із ХГ та застосування PRP у якості коректора місце розрізу було заповнено запальним детритом, поодинокими фібробластами, тонкими колагеновими фібрилами, великою кількістю тромбоцитів та еритроцитів з деструктивними змінами різного ступеню. Крім того, серед клітин відзначалися лейкоцитарні агранулоцити (рис. 3.7).

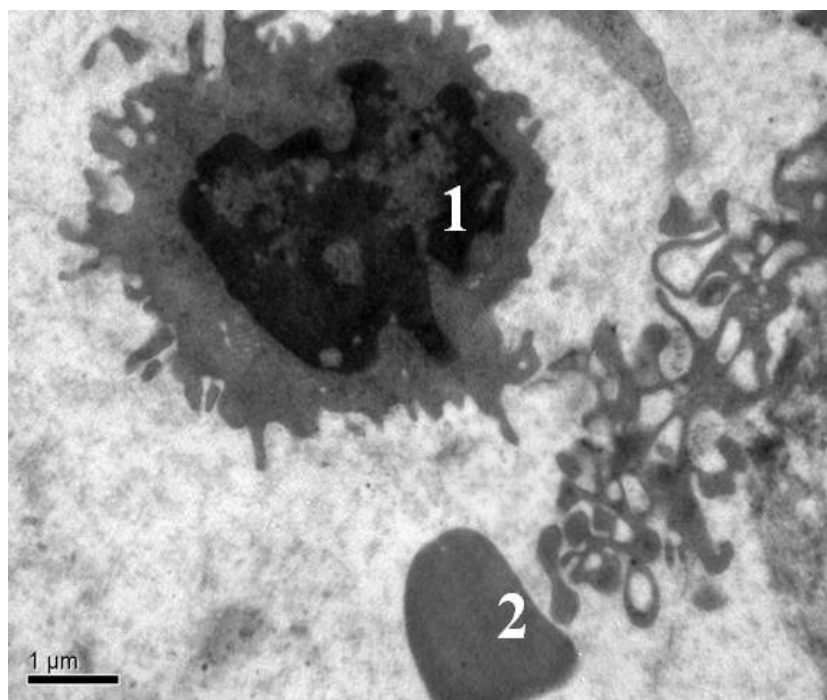


Рисунок 3.7 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура із ХГ на 3 добу після нанесення травми та застосування PRP. Лімфоцит (1), еритроцит (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. X8000

На 14 добу експерименту у ділянці дефекту спостерігались активовані міогенні клітини, що зливалися з утворенням міотуб (рис. 3.8). Ядра таких клітин містили значну кількість еухроматину. У цитоплазмі відзначалось утворення нових міофіламентів із чітко диференційованою саркомерною організацією.

На 28 добу після нанесення травми та застосування PRP регенерат складався із масивних тяжів сполучної тканини, великої кількості судин та різної форми м'язових волокон. Цитоплазма м'язових клітин містила здебільшого правильної форми ядра, значну кількість мітохондрії в перинуклеарному просторі та пучки міофібрил із хвилястою і частково розірваною Z-лінією (рис. 3.9).

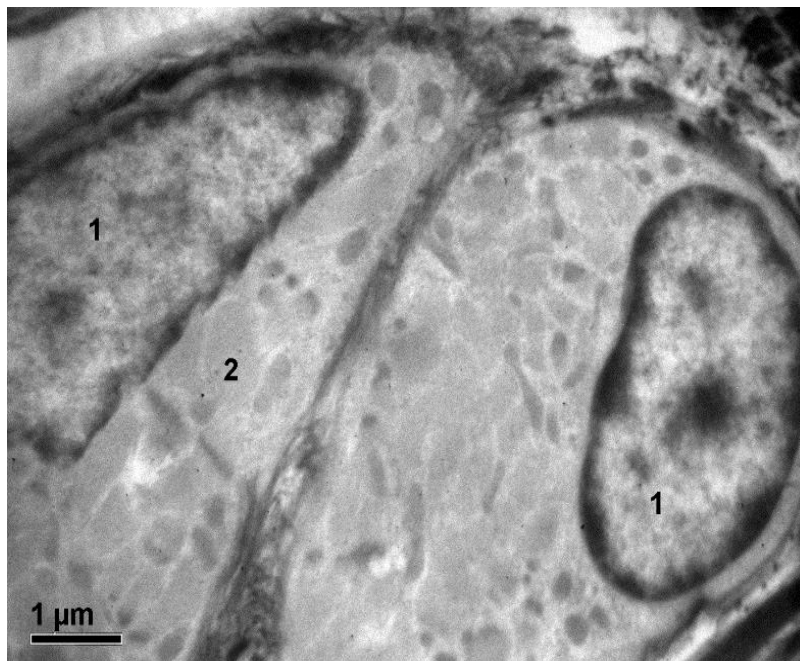


Рисунок 3.8 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура із ХГ на 14 добу після нанесення травми та застосування PRP. Ядро міогенної клітини (1), міофіламент (2). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. X6200

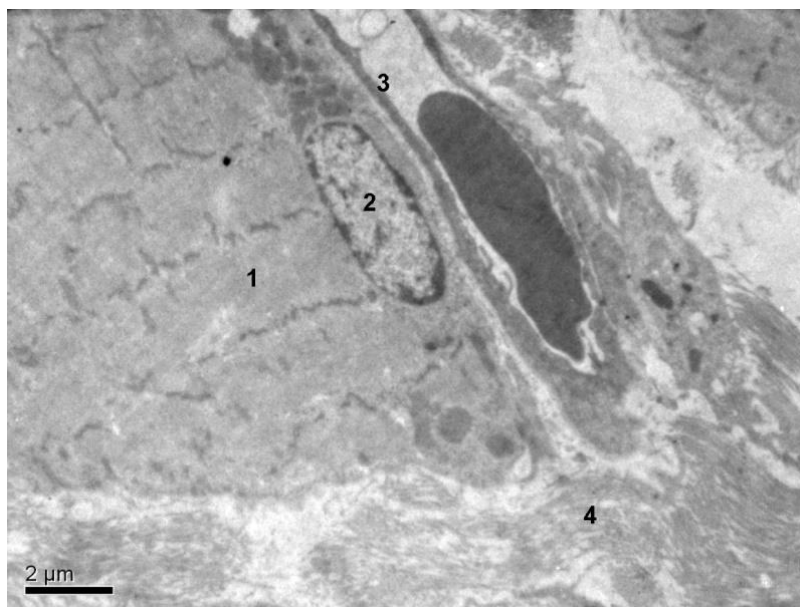


Рисунок 3.9 – Ділянка дефекту триголового м'яза литки щура із ХГ на 28 добу після нанесення травми та застосування PRP. Міофіламент (1), ядро міосимпласта (2), капіляр (3), ендомізій (4). Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Зб. X4500

Ультрамiкроскопiчний аналіз процесу посттравматичної регенерації скелетних м'язів щурів із ХГ виявив у ранні терміни переважання гранулоцитів на тлі зменшеної кількості агранулоцитів. Схожі результати були отримані Krause et al, що продемонстрували зменшення кількості макрофагів в регенеруючих м'язах щурів із ЦД1 типу [98]. Разом із цим Nguyen et al. виявили зменшення вмісту макрофагів у регенератах скелетних м'язів щурів із генетичними моделями ЦД2 типу [99]. Дослідження останніх років показали, що макрофаги є необхідною умовою успішної регенерації скелетних м'язів. Ці клітини виступають важливим регуляторним чинником у процесі посттравматичної активації камбіальних клітин м'язів [100]. Xiao et al. показано, що зменшення кількості макрофагів у скелетних м'язах призводить до надмірного розвитку сполучної тканини та зменшення розміру новоутворених м'язових волокон під час посттравматичного відновлення [101].

У нашій роботі було встановлено зменшення кількості та розміру новоутворених волокон у регенеруючих посмугованих м'язах щурів із ХГ. Поряд із цим Jeong et al. показали, що у щурів зі стрептозотоцин-індукованим ЦД спостерігається значне зменшення кількості регенеруючих м'язових волокон під час посттравматичної регенерації [103]. Крім цього, процес регенерації м'язів у щурів із генетичними моделями ЦД також характеризувався значущим зменшення активності та кількості сателітоцитів [99].

Слід також сказати, що процес відновлення скелетних м'язів щурів із ХГ характеризувався масивним утворенням колагенових волокон, затримкою та незавершеністю, що здебільшого відповідає результатам, отриманих під час інших подібних досліджень [98, 99].

Нещодавній огляд Setayesh et al. [102] показав, що PRP сприяє регенерації скелетних м'язів за допомогою анаболічних факторів росту, що виділяються з активованих тромбоцитів, і, таким чином, зменшує ознаки запалення та час відновлення. Поряд із цим два мета-аналізи показали, що місцеве застосування PRP під час лікування діабетичних виразок пришвидшує загоєння ран та значно

зменшує кількість ускладнень [104, 105]. Враховуючи це ми вирішили дослідити вплив PRP на процес регенерації скелетних м'язів у щурів із ХГ.

Результати ультраструктурного аналізу у групі тварин із ХГ, яким було виконане уведення PRP, показали, що вираженість та характер запалення відрізнявся від щурів із ХГ да здебільшого був схожий із контрольною групою. Слід сказати, що Gigante et al. [106] повідомили, що перебіг запалення під час регенерації скелетних м'язів щурів, яким вводили у рану PRP не відрізнявся від щурів без застосування PRP.

Застосування PRP у щурів із ХГ під час нашого дослідження призвело до активації неоангіогенезу, в результаті чого кількість судин в регенератах м'язів щурів цієї групи була практично такою ж як і в контрольній групі. Посилення неоангіогенезу під час м'язового відновлення після застосування PRP було виявлено і колективом Gigante et al. [106]. Результати нашого дослідження також показали, що у щурів із ХГ використання PRP призводить до збільшення кількості регенеруючих волокон та зростання їх загальної площі, що значно відрізняється від тварин із ХГ та без використання PRP. Збільшення кількості новоутворених волокон внаслідок застосування PRP під час м'язового відновлення було виявлено і низкою інших досліджень на тваринах із різними моделями механічного ушкодження [107-109]. Разом із цим у цих роботах також повідомляється про зменшення площі колагену та ступеню фіброзу в регенератах посмугованих м'язів внаслідок використання PRP.

Наведені результати предаставлені у публікації авторів: Ртайл РА, Максимова ОС, Ткач ГФ. Ультраструктурний аналіз регенерації скелетних м'язів щурів за умов хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми. Вісник проблем біології і медицини. 2020;3(157):524-529 [111].

ВИСНОВКИ

1. Хронічна гіперглікемія організму призводить до затримання ліквідації запалення у місці кісткового дефекту, що робить процес репаративного остеогенезу більш тривалішим. Відбувається порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми коректує негативний вплив хронічної гіперглікемії на процеси репаративного остеогенезу. Швидше наступає очищення місця дефекту від запального інфільтрату, формування остеогенних балок, ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини у пластинчасту. Репаративний остеогенез проходить по типу остеобластичного диферону.

2. Ультрамiкроскопiчний аналіз виявив негативний вплив ХГ на процес посттравматичної регенерації скелетних м'язів, що характеризується масивним розвитком елементів сполучної тканини на тлі пригнічення та недосконалого формування нових м'язових волокон. Застосування PRP у щурів із ХГ покращує процес м'язового відновлення, зміщуючи його від розвитку сполучнотканинного рубця в бік формування повноцінного м'язового органу.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Гур'єв СО, Танасієнко ПВ, Ковалишин ІВ, Балясевич СЯ. Характеристика хребтово-спинномозкових пошкоджень у постраждалих з абдоміно-вертебральною травмою в результаті дорожньо-транспортних пригод. Літопис травматології та ортопедії. 2018;№3-4:20-23.

2. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 2018;185:240-275. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.028.

3. Paschou SA, Dede AD, Anagnostis PG et al. Type 2 diabetes and osteoporosis: a guide to optimal management. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017;102(10):3621-3634. DOI: org/10.1210/jc.2017-00042.

4. Ferrari SL, Abrahamsen B, Napoli N et al. Diagnosis and management of bone fragility in diabetes: an emerging challenge. *Osteoporosis International*. 2018;29(12):2585-2596. DOI: org/10.1007/s00198-018-4650-2

5. Бідула СВ, Христенко ЮО, Ларін ОО. Еластично стабільний інтрамедулярний нейлінг гнучкими стрижнями ChM в лікуванні переломів у дітей. *Проблеми травматології та остеосинтезу*. 2019;1-2(15-16):85.

6. Russo GT, Giandalia A, Romeo EL et al. Fracture risk in type 2 diabetes: current perspectives and gender differences. *Int. J. Endocrinol.* 2016;461-11. DOI: 10.1155/2016/1615735.

7. Sadighi A, Bazavar M, Niafar M et al. Effect of diabetes mellitus type II on long bones fractures healing. *Advances in Bioscience & Clinical Medicine*. 2015:10-16. DOI: 10.7575/aiac.abcm.15.03.03.03

8. 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.

9. 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.

10. 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):233-244.

11. Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? Arthritis Res Ther. 2012;14(4):219. doi: 10.1186/ar3914.

12. Bakhtiar H, Esmaeili S, Fakhr Tabatabayi S, 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.

13. Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR et al. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. 2016;56(supplement 1):S52–S64. doi: 10.1111/trf.13455.

14. Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ et al. 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.

15. Xiao S-E, Miao Y, Wang J et al. As a carrier-Transporter for hair follicle reconstitution, platelet-rich plasma promotes proliferation and induction of mouse dermal papilla cells. 2017;7(1, article no. 1125) doi: 10.1038/s41598-017-01105-8.

16. 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. 2017:1–6. doi: 10.1080/09537104.2017.1327655.

17. Rojas S, Pérez del Caz MD, Esteban Vico JR 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.

18. 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. 2015;11(1, article 60) doi: 10.1186/s12917-015-0370-4.
19. Jianying Zhang, Daibang Nie, Kelly Williamson, Jorge L Rocha, MaCalus V Hogan, and James H-C Wang. Selectively activated PRP exerts differential effects on tendon stem/progenitor cells and tendon healing. *J Tissue Eng.* 2019 Jan-Dec; 10: 2041731418820034. doi: 10.1177/2041731418820034
20. Andia I, Martin JJ, Maffulli N. Platelet-rich Plasma and Mesenchymal Stem Cells: Exciting, But ... are we there Yet? *Sports Med Arthrosc Rev.* 2018 Jun;26(2):59-63. doi: 10.1097/JSA.000000000000191.
21. Waters JH, Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J. Extra Corpor. Technol.* 36: 250, 2004.
22. 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. 2015;2015 doi: 10.1155/2015/846045.846045
23. Augustine TN, Van Der Spuy WJ, Kaberry L, Shayi M. Thrombin-Mediated Platelet Activation of Lysed Whole Blood and Platelet-Rich Plasma: A Comparison between Platelet Activation Markers and Ultrastructural Alterations. 2016;22(3):630-639. doi: 10.1017/S1431927616000854
24. Fioravanti C, Frustaci I, Armellin E, Condò R, Arcuri C, Cerroni L. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. 2016;8(4):96-113. doi: 10.11138/orl/2015.8.4.096.
25. Law JX, Chowdhury SR, Saim AB, Idrus RBH. 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.
26. Suthar M, Gupta S, Bukhari S, Ponemone V. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. 2017;24(1). doi: 10.1186/s12929-017-0324-1.

27. 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 Jul/Aug;11(4):355-366. doi: 10.1177/1941738119834972.
28. 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.
29. Myung H, Jang H, Myung JK 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.
30. Zhang Y, Morgan BJ, Smith R. et al. Platelet-rich plasma induces post-natal maturation of immature articular cartilage and correlates with LOXL1 activation. 2017;7. doi: 10.1038/s41598-017-02297-9.
31. Badran Z, Abdallah M, Torres J, Tamimi F. Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges. 2017:1-8. doi: 10.1080/09537104.2017.1327656.
32. 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/bjism.2007.040071.
33. 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.
34. Gajovich IV. Application of platelet-rich plasma (PRP) in traumatic damages of ligaments the problems of traumatology and osteosynthesis. 2015;№2(2)
35. Manish Suthar, Saniya Gupta, Suhail Bukhari, and Venkatesh Ponemone Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series *J Biomed Sci*. 2017;24:16. doi: 10.1186/s12929-017-0324-1
36. Masoomeh Gholami, Hamid Ravaghi, Masoud Salehi, Amirhosein Abedi Yekta, Shila Doaee, and Ebrahim Jaafaripooyan 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

37. 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.

38. 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.

39. Tengbo Yu, Huazheng Pan, Yanling Hu, Hao Tao, Kai Wang, and Chengdong Zhang 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

40. Малыгина МА, Боровкова НВ, Сахарова ОМ, Пономарев ИН. Применение богатой тромбоцитами плазмы при заболеваниях и повреждениях опорно-двигательного аппарата DOI:10.23873/2074-0506-2017-9-4-325-334

41. 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).

42. Климовицкий ВГ, Соловьев ИА. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в лечении повреждений мягких и костных тканей. *Травма (Украина)*. 2015;16(6):77-80.

43. Варес ЯЕ, Сліпий ВЗ. Застосування збагаченого тромбоцитами фібрину в хірургічній стоматології. Частина II Заміщення внутрішньо кісткових дефектів щелеп. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016;4(133).

44. Anitua e., Sánchez M., Nurden a.T., Zalduendo M.M., 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.

45. 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 osseointegrative bone substitute material in beagle dogs. *Fogorv Sz*. 2004;97(1):23-27.

46. 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

47. Климовицкий В.Г., Соловьев И.А. Применение плазмы обогатенной тромбоцитами. 2015;16(6).

48. Yu Gil Park, In Ho Lee, Eun Soo Park, and Jin Young Kim Hydrogel and Platelet-Rich Plasma Combined Treatment to Accelerate Wound Healing in a Nude Mouse Model Arch Plast Surg. 2017;44(3):194-201. doi: 10.5999/aps.2017.44.3.194

49. 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.

50. Anirudh Somani and Reena Rai Comparison of Efficacy of Autologous Platelet-rich Fibrin versus Saline Dressing in Chronic Venous Leg Ulcers: A Randomised Controlled Trial J Cutan Aesthet Surg 2017;10(1):8-12. doi: 10.4103/JCAS.JCAS_137_16

51. Sony Pandey, Dawn U. Hickey, Marti Drum, Darryl L. Millis, and Maria Cekanova Platelet-rich plasma affects the proliferation of canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in vitro BMC Vet Res. 2019;15:269. doi: 10.1186/s12917-019-2010-x

52. Damien P Kuffler Variables affecting the potential efficacy of PRP in providing chronic pain relief. J Pain Res. 2019;12:109-116. doi: 10.2147/JPR.S190065

53. 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.

54. 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. 2014;10(3):417-28. doi: 10.1007/s12015-013-9494-8.

55. 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. Epub 2009 Jan 31.

56. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (LPRF). Trends in Biotechnology (Impact Factor: 9.66). 2009;27(3):158-67

57. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. Curr Pharm Biotechnol. 2011;8.

58. 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

59. Wang X., Zhang Y., Choukroun J., Ghanaati S., Miron R. J. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. 2017:1-8. doi: 10.1080/09537104.2017.1293807.

60. Dohan Ehrenfest DM., Pinto NR., Pereda A 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. 2017:1-14. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812.

61. Cabaro S, D'Esposito V, Gasparro R et al. White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. 2017:1-5. doi: 10.1080/09537104.2017.1319046.

62. Abd El Raouf M., Wang X., Miusi S., et al. Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. 2017:1-9. doi: 10.1080/09537104.2017.1401058.

63. 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.

64. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support its Use. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2004; 62:489-496.

65. 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):106-116. DOI: 10.21823/2311-2905-2015-0-2-106-116.

66. Макаров МС, Пономарев ИН. Роль богатой тромбоцитами плазмы в репарации дефектов костной ткани. 2015;10. doi: 10.17116/hirurgia20151094-99

67. 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.

68. Lijuan Du, Yong Miao, Xin Li, Panli Shi, and Zhiqi Hu. 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

69. 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.

70. Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(8):582-587.

71. Gigante A, del Torto M, Manzotti S et al. Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2012;26(3):475-484.

72. Contreras-Muñoz P, Torrella JR, Serres X et al. Postinjury exercise and platelet-rich plasma therapies improve skeletal muscle healing in rats but are not synergistic when combined. *The American Journal of Sports Medicine*. 2017;45(9):2131-2141.

73. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *The American Journal of Sports Medicine*. 2009;37(6):1135-1142.

74. Quarteiro ML, Tognini JRF, de Oliveira ELF, Silveira I. The effect of platelet-rich plasma on the repair of muscle injuries in rats. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2015;50(5):586-595.

75. Tsai WC, Yu TY, Chang GJ, Lin LP, Lin MS, Pang JHS. Platelet-rich plasma releasate promotes regeneration and decreases inflammation and apoptosis of injured skeletal muscle. *The American Journal of Sports Medicine*. 2018;46(8):1980-1986.

76. Hamid MSA, Ali MRM, Yusof A, George J. Platelet-rich plasma (PRP): an adjuvant to hasten hamstring muscle recovery. A randomized controlled trial protocol (ISCR TN66528592). *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2012;13(1).

77. Nitecka-Buchta A, Walczynska-Dragon K, Kempa WM, Baron S. Platelet-rich plasma intramuscular injections - antinociceptive therapy in myofascial pain within masseter muscles in temporomandibular disorders patients: a pilot study. *Frontiers in Neurology*. 2019;10.

78. Hamilton AH, Best TM. Platelet-enriched plasma and muscle strain injuries: challenges imposed by the burden of proof. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2011;21(1):31-36.

79. Villela DL, Santos VLÚCIACG. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors* 2009;28(2):111-116.

80. Hu Z, Qu S, Zhang J. Efficacy and safety of platelet-rich plasma for patients with diabetic ulcers: a systematic review and meta-analysis. *Advances in Wound Care*. 2019;8(7):298-308.

81. Hirase T, Ruff E, Surani S, Ratnani I. Topical application of platelet-rich plasma for diabetic foot ulcers: a systematic review. *World Journal of Diabetes*. 2018;9(10):172-179.

82. 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.

83. 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.

84. 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):233-244.

85. Baimukanova G, Miyazawa B, Potter D et al. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. *Transfusion*. 2016;56(1):52-64. DOI: 10.1111/trf.13455.

86. 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. DOI: 10.1186/s12917-015-0370-4.

87. Sadighi A, Bazavar M, Niafar M et al. Effect of diabetes mellitus type II on long bones fractures healing. *Advances in Bioscience and Clinical Medicine*. 2015;3(3):10-16.

88. Marsell R, Einhorn T. The biology of fracture healing. *Injuru*. 2011;42(6):551-555.

89. Волотовский АИ, Макаревич ЕР, Чирак ВЭ. Регенерация костной ткани в норме и при патологии. БГМУ. 2010;24 с.

90. Brown M, Yukata K, Farnsworth C. 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):1-11.

91. Marin C, Luyten FP, Bart Van der Schueren et al. The impact of type 2 diabetes on bone fracture healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(6). DOI: org/10.3389/fendo.2018.00006.

92. Hygum K, Starup-Linde J, Langdahl BL. Diabetes and bone. Osteoporosis and Sarcopenia. 2019;5:29-37. DOI: 10.1016/j.afos.2019.05.001.

93. Ялочкина ТО, Белая ЖЕ. Низкотравматичные переломы и костное ремоделирование при сахарном диабете 2-го типа. Ожирение и метаболизм. 2017;14(3):11-18. DOI: 10.14341/OMET2017311-18.

94. Дедух НВ, Сыкал АА. Регенерация кости при сахарном диабете 2-го типа (экспериментальное исследование). Проблемы остеології. 2015;18(4):12-18.
95. Mangialardi G, Ferland-McCollough D, Maselli D et al. Bone marrow pericyte dysfunction in individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(7):1275-1290. DOI: 10.1007/s00125-019-4865-6.
96. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances (in vitro study). *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2007;89(3):417-420.
97. Messori MR, Nagata MJH, Furlaneto FAC. A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO*. 2011;8(3):299–304.
98. Krause MP, Al-Sajee D, D'Souza DM, Rebalka IA, Moradi J, Riddell MC, et al. Impaired macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific fashion following injury in diabetic skeletal muscle. *PLoS One*. 2013;8(8):e70971. DOI: 10.1371/journal.pone.0070971.
99. Nguyen MH, Cheng M, Koh TJ. Impaired muscle regeneration in Ob/ob and Db/db mice. *Scientific World Journal*. 2011;11:1525-35. DOI: 10.1100/tsw.2011.137.
100. Ceafalan LC, Fertig TE, Popescu AC, Popescu BO, Hinescu ME, Gherghiceanu M. Skeletal muscle regeneration involves macrophage-myoblast bonding. *Cell Adh Migr*. 2018;12(3):228-35. DOI: 10.1080/19336918.2017.1346774.
101. Xiao W, Liu Y, Chen P. Macrophage Depletion Impairs Skeletal Muscle Regeneration: the Roles of Pro-fibrotic Factors, Inflammation, and Oxidative Stress. *Inflammation*. 2016;39(6):2016-28. DOI: 10.1007/s10753-016-0438-8.
102. Setayesh K, Villarreal A, Gottschalk A, Tokish JM, Choate WS. Treatment of Muscle Injuries with Platelet-Rich Plasma: a Review of the Literature. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2018;11(4):635-42. DOI: 10.1007/s12178-018-9526-8.
103. Jeong J, Conboy MJ, Conboy IM. Pharmacological inhibition of myostatin/TGF- β receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(8):1052-60. DOI: 10.1038/aps.2013.67.

104. Hamid MS, Yusof A, Mohamed Ali MR. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: a systematic review. *PLoS One*. 2014;9(2):e90538. DOI: 10.1371/journal.pone.0090538.
105. Grassi A, Napoli F, Romandini I, Samuelsson K, Zaffagnini S, Candrian C, et al. Is Platelet-Rich Plasma (PRP) Effective in the Treatment of Acute Muscle Injuries? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med*. 2018;48(4):971-89. DOI: 10.1007/s40279-018-0860-1.
106. Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, Cianforlini M, Busilacchi A, Davidson PA, et al. Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26(3):475-84.
107. Contreras-Muñoz P, Torrella JR, Serres X, Rizo-Roca D, De la Varga M, Viscor G, et al. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combined. *Am J Sports Med*. 2017;45(9):2131-41. DOI: 10.1177/0363546517702864.
108. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med*. 2009;37(6):1135-42. DOI: 10.1177/0363546508330974.
109. Quarteiro ML, Tognini JR, de Oliveira EL, Silveira I. The effect of platelet-rich plasma on the repair of muscle injuries in rats. *Rev Bras Ortop*. 2015;50(5):586-95. DOI: 10.1016/j.rboe.2015.08.009.
110. Dudchenko Ye, Maksymova O, Pikaliuk V, Muravskiy D, Kyptenko L, Tkach G. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. *Analytical Cellular Pathology*, 2020; 2020, ID 5472841.
111. Ртайл РА, Максимова ОС, Ткач ГФ. Ультроструктурний аналіз регенерації скелетних м'язів щурів за умов хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020;3(157):524-529.