

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ШЕВЧЕНКО СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА**

УДК 636.7.09:616.71-001.5-089.2:615.464:546.41:549.752/.757(043.5)

**КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ІМПЛАНТАЦІЇ  
ТРОМБОЦИТАРНИХ КОНЦЕНТРАТІВ ТА ЇХ КОМПОЗИТІВ ІЗ  
КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНОЮ КЕРАМІКОЮ  
ЗА ПЕРЕЛОМІВ КІСТОК У СОБАК**

Спеціальність: 211 – «Ветеринарна медицина»

Галузь знань: 21 – «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

 С.М. Шевченко

Науковий керівник:

**Рубленко Михайло Васильович**

доктор ветеринарних наук,

професор, академік НААН

## АНОТАЦІЯ

Шевченко С.М. Клініко-експериментальне обґрунтування імплантації тромбоцитарних концентратів та їх композитів із кальцій-фосфатною керамікою за переломів кісток у собак. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 – Ветеринарна медицина). Білоцерківський національний аграрний університет. Біла Церква, 2023.

Клініко-експериментально обґрунтовано вплив імплантації у міжуламкові простори різних форм збагаченого тромбоцитами аутофібрину та його композиту з кальцій-фосфатною керамікою за остеозаміщення на репаративний остеогенез, що є новим у вирішенні проблеми оптимізації консолідації різних типів переломів довгих трубчастих кісток у тварин. Клініко-рентгенологічно, макро- і гістоморфологічно та на підставі гематологічних, біохімічних і молекулярно-біологічних критеріїв оцінювання доведено, що за імплантації у кісткові дефекти тромбоцитарних концентратів реалізуються їх остеоіндуктивні властивості з індукцією неоангіогенезу та формуванням ранньої остеобластичної реакції, а за композитного остеозаміщення і пластинчастої кісткової тканини, що також підтверджується реактивним тромбоцитозом, фазовими піками оксиду азоту та біохімічних маркерів кісткового метаболізму, усуненням дисбалансу між остеорезорбтивними і остеогенними процесами репаративного остеогенезу.

Цитологічно та гістологічно встановлено ділянки концентрування тромбоцитів у зразках PRP і PRF за різних величин відносної відцентрової сили центрифугування. Зокрема, в діапазоні 100–1843 g відцентрової сили центрифугування зразків крові найбільша концентрація тромбоцитів у одержаній плазмі кролів досягається за 100 g протягом 3 хв –  $824 \pm 30,4$  Г/л, та 400 g (10 хв) –  $550 \pm 21,2$  Г/л, за їх умісту в цільній крові –  $210 \pm 9,6$  Г/л ( $p < 0,001$ ). При цьому зі збільшенням цієї величини за 10 хв вміст тромбоцитів у плазмі

крові динамічно зменшується від  $322 \pm 18,8$  Г/л за 735 g до  $20 \pm 4,5$  Г/л за 1843 g ( $p < 0,001$ ).

Різні величини відносної відцентрової сили центрифугування крові також суттєво впливають на розподіл клітинних елементів у згустках фібрину. Поряд зі збільшенням параметрів центрифугування ділянки концентрування тромбоцитів зміщуються в бік еритроцитарної маси. При цьому макроморфологічно довжина згустків фібрину за центрифугування зразків крові в діапазоні 100–1843 g відцентрової сили збільшується із гістологічно рівномірним розподілом тромбоцитів у фібринових згустках одержаних за 400 g, що загалом обґрунтовує оптимальні режими центрифугування зразків крові для одержання плазми чи фібрину, збагачених тромбоцитами, в діапазоні 100–400 g.

Вперше клініко-рентгенологічним дослідженням встановлено, що імплантація PRP-матеріалів у кісткові дефекти компактної чи губчастої кістки кролів характеризується, порівняно з їх загоєнням під кров'яним згустком, ранньою пери- і ендоостальною реакціями та формуванням остеїда різного ступеня рентгенощільності. Водночас у разі остеозаміщення композитом PRF+HA/ $\beta$ -TCP–700 спостерігається ранній і потужний розвиток остеогенних процесів, які відбуваються переважно завдяки ендоосту з точковим остеосклерозом уже на 21-шу добу. Проте за імплантування у кісткові дефекти кролів ксеногенного PRF запально-резорбтивні процеси продовжуються в часі, що гальмує остеогенну реакцію, а рентгенонегативність кісткового дефекту встановлена навіть на 42-гу добу із зоною підвищеної рентгенощільності навколо нього.

Заразом бальна макроморфологічна оцінка кісткових регенератів за їх об'ємом, щільністю та ступенем контакту з материнською кісткою фактично не залежала від речовини кісткової тканини – губчаста чи компактна. При цьому за імплантації ауто-PRF чи композитного остеозаміщення макроморфологічні показники щільності кісткових регенератів та їх зв'язку з материнською кісткою більші, ніж у контрольних, в 1,3–1,4 та 1,3–1,8 рази,

відповідно. Водночас репаративний остеогенез у кролів за імплантації у кісткові дефекти ауто-PRF-матеріалів гістоморфологічно характеризується більш ранньою остеобластичною реакцією із формуванням елементів губчастої кісткової тканини на 14-ту добу та остеонів на 42-гу, у випадку ксено-PRF імплантації спостезігається надмірна та подовжена в часі до 42-ї доби хондрійна реакція, тимчасом за композитного остеозаміщення – більш ранніми остеобластичною реакцією та неоангіогенезом на 14-ту добу з формуванням елементів пластинчастої кісткової тканини і, зокрема, в межах гранул з поступовою їх біодеградацією та утворенням остеонів у період 21-ї доби. Заразом за бальною оцінкою гістологічних критеріїв кісткових регенератів на 42-гу добу за типом новосформованої тканини, об'ємом трабекул та остеонів, щільністю розміщення та кількістю клітин у їх товщі і на поверхні не залежить від типу – губчастої чи компактної речовини пластинчастої кісткової тканини. Однак, за імплантації ксенологічного PRF її показники на 42-гу добу репаративного остеогенезу були меншими на відміну від контрольної групи в 1,3–1,4 раза ( $p < 0,001$ ). Натомість за імплантації аутологічних і-PRF, PRF чи композитного остеозаміщення PRF із кальцій-фосфатною керамікою вони виявилися більшими в 1,1–1,2 раза ( $p < 0,01–0,001$ ), в 1,3 ( $p < 0,001$ ) та 1,3–1,4 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно, що засвідчує їх остеоіндуктивні та остеоінтеграційні властивості.

Отже, за сукупністю клініко-рентгенологічних, макро- і гістоморфологічних досліджень встановлено наступну закономірність щодо ступеня впливу PRP-матеріалів на перебіг репаративного остеогенезу в кролів за модельних переломів губчастої та компактної кістки: PRP < і-PRF < PRF < PRF+HA/β-TCP.

Водночас встановлено, що імплантація у кісткові дефекти кролів різних типів PRP-матеріалів супроводжується помірною і швидкоплинною еритроцитопенією впродовж перших 7-ми діб репаративного остеогенезу, яка менш виражена в групах застосування ауто-PRF-матеріалів, але не ксенологічних. Заразом помірне зменшення концентрації в крові гемоглобіну

в цей період відбувається в межах фізіологічної норми. При цьому комплексне застосування PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700 супроводжується достовірно вищим рівнем у крові еритроцитів у період 14–42-ї доби репаративного остеогенезу. Також набуває розвитку реактивний тромбоцитоз, особливо виражений упродовж 7–14-ї доби у разі використання PRF та з піками на 3-тю і 14-ту добу за композитного остеозаміщення PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700, що є свідченням реалізації впливу їх компонентів на кісткову регенерацію.

Кістковий метаболізм у кролів за рівнем активності у сироватці крові кісткових біохімічних маркерів у разі імплантації у кісткові дефекти PRF-матеріалів чи їх композитної форми характеризується раннім, уже на 3-тю добу, підвищенням активності кісткової лужної фосфатази з наступним її піком на 14-ту, а за остеозаміщення PRF-умісним керамічним композитом – 7–14-ту та 42-гу добу, що відображає інтенсивність процесів остеогенезу та раннього ремоделювання кісткових регенератів, які помірні за імплантації PRP. Натомість у випадках загоєння під кров'яним згустком та за використання ксено-PRF відтерміновані в часі (21–42-а доба) і відповідно до динаміки активності загальної лужної фосфатази містять суттєвий запально-резорбтивний компонент. Загалом доведено, що за рівнем і фазністю динамічних змін активності кісткової лужної фосфатази аутологічний PRF справляє суттєвий вплив на інтенсивність процесів остеогенезу, які у випадку його комбінації з остеозаміщувальним матеріалом набувають потужного прояву, а це, зокрема, свідчить про остеоіндуктивні властивості PRF. Загоєння кісткових дефектів у кролів також характеризується в ранній (на 3–7-му добу) посттравматичний період остеорезорбцією із підвищенням активності її маркера тартрат-резистентної кислої фосфатази в 3,5–3,7 раза ( $p < 0,001$ ). При цьому в контрольній групі та за імплантації ксено-PRF вона має помірний і перманентний стан, а за використання ауто-PRF чи композитного остеозаміщення має ще один пік зі збільшенням у 2,7–3,5 раза ( $p < 0,001$ ) на 42-гу добу, що відображає динамічну зміну стадій репаративного остеогенезу. Водночас композитне остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою з PRF за

двофазністю збільшення індекса Петерсона та найменшого в період 7–21-ї доби фосфатазного індекса супроводжується активним перерозподілом макроелементів, інтенсивним остеогенезом і помірною остеорезорбцією за ремоделювання кісткового регенерату, що загалом забезпечує оптимізовану консолідацію модельного перелому.

Встановлено, що реакція гострої фази за імплантації PRP-матеріалів у кісткові дефекти кролів характеризується двофазною гаптоглобінемією на 3-тю та 14-ту добу, що спочатку відображає формування запально-резорбтивної стадії, а потім молекулярно-клітинні механізми заміщення сполучно-тканинного і хрящового мозоля кістковою тканиною. Менш інтенсивно вона виражена за використання PRF і композитного остеозаміщення (підвищення лише в 1,1–1,2 раза, а в решті випадків у 1,3–1,5 раза,  $p < 0,001$ ) та супроводжується за імплантації PRP-матеріалів позитивною динамікою рівня в сироватці крові загального білка, підвищенням концентрації альбуміну в ранній посттравматичний період. Заразом загоєння дефектів трубчастих кісток у кролів під кров'яним згустком супроводжується перманентним підвищенням рівня в крові оксиду азоту з досягненням пікового значення на 14-ту добу репаративного остеогенезу з наступним зниженням та помірно збільшеною концентрацією на 21-шу добу. За імплантації PRP характерне помірне його підвищення впродовж усіх термінів дослідження з високим піковим значенням на 14-ту добу. За імплантації аутологічного PRF та i-PRF встановлені високі рівні оксиду азоту перманентного прояву з двофазними піками на 3-тю добу та 21- і 42-гу, відповідно, тимчасом за ксенологічного PRF – перманентне помірне підвищення. Проте, остеозаміщення кісткових дефектів у 5-й дослідній групі (PRF+HA/ $\beta$ -TCP–700) супроводжувалося двома піками рівня оксиду азоту – на 14-ту та 42-гу добу, що є відображенням інтенсивного неоангіогенезу та відповідно ремоделювання кісткового регенерату.

Встановлено, що консолідація переломів довгих трубчастих кісток у собак після накісткового остеосинтезу супроводжується тривалою

еритроцитопенією і лейкоцитарною реакцією впродовж 42-х діб. У ранній посттравматичний період рівень загального білка та альбуміну залишається в межах фізіологічної норми, проте з певною тенденцією до формування гіпоальбумінемії. У разі PRF-імплантації чи композитного остеозаміщення це явище швидкоплинне та менш інтенсивне. Водночас перманентне підвищення гаптоглобіну не лише відображає інтенсивність запально-резорбтивної стадії, а також свідчить про його участь у репаративному остеогенезі як носія гемоглобіну. Заразом розвивається гіперкоагуляційний синдром з дефіцитом антитромбінової активності (до 21-ї доби), які за PRF-остеоімплантації чи композитного остеозаміщення усуваються на 21-шу, 14-, 7- та 14-ту добу, відповідно, без змін концентрації імунорегуляторного інгібітора  $\alpha 2$ -макроглобуліну. Водночас встановлено, що підвищений рівень у сироватці крові оксиду азоту за накісткового остеосинтезу переломів трубчастих кісток у собак утримувався впродовж перших 7-ми діб репаративного остеогенезу. За використання імплантаційних матеріалів його рівень збільшувався в 1,5–1,9 раза ( $p < 0,001$ ) в період з 7- до 42-ї доби з піками на 21-шу за PRF-імплантації та 7- і 21-шу добу за композитного остеозаміщення, що відображає їх остеоіндуктивність та інтенсивність неоангіогенезу на різних стадіях репаративного остеогенезу.

Консолідація переломів довгих трубчастих кісток у собак в умовах накісткового остеосинтезу супроводжується піками активності в сироватці крові загальної лужної фосфатази на 3-тю та 21-шу добу з достовірно меншим її рівнем і нормалізацією на 42-гу добу в разі застосування PRF-матеріалів. Водночас виникає перманентне підвищення активності її кісткового ізоферменту – маркера остеогенезу з піком на 21- та 14-ту добу, відповідно, за імплантації i-PRF чи PRF, а за композитного остеозаміщення – на 7–14-ту добу. Формування піку активності тартрат-резистентної кислої фосфатази за накісткового остеосинтезу встановлено на 42-гу добу, на 21–42-гу – за додаткової імплантації PRF-матеріалів і на 14–21-шу – за композитного остеозаміщення. Це свідчить про ранню остеобластичну реакцію, менший та

оптимізований рівень остеорезорбтивних процесів, раннє ремоделювання кісткового регенерату, що також узгоджується з динамікою перерозподілу в межах кісткової системи Ca та P за зміною величини їх співвідношення.

Вперше доведено, що імплантація і-PRF чи PRF в міжуламкові простори за неосколкових та остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак прискорює консолідацію таких переломів. При цьому рентгенологічна візуалізація та динаміка біохімічних маркерів кісткового метаболізму засвідчують менший рівень запально-резорбтивних процесів у ділянці кісткової травми та раннє і динамічне формування кісткового регенерату завдяки ендоостальному остеогенезу, особливо у випадку композитного остеозаміщення.

Обґрунтовано і запропоновано імплантацію PRF-матеріалів та композиту кальцій-фосфатної кераміки з PRF для остеїмплантації у випадку неосколкових та осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак з метою оптимізації та прискорення їх консолідації, що апробовано і підтверджено відповідними актами про впровадження в низці клінік дрібних домашніх тварин України. Розроблено і затверджено на засіданні Вченої ради факультету ветеринарної медицини БНАУ протокол №10 від 26 червня 2022 року методичні рекомендації: Шевченко С. М., Рубленко М. В. Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині. Біла Церква: БНАУ, 2022. 23 с.

Матеріали дисертації використовуються під час вивчення дисциплін «Загальна і спеціальна ветеринарна хірургія», «Травматологія і ортопедія дрібних домашніх тварин», «Ветеринарна хірургія», «Хвороби собак і котів», «Хвороби дрібних тварин», «Хірургічні хвороби тварин з анестезіологією» на факультетах ветеринарної медицини вищих навчальних закладів та у наукових дослідженнях 6-ти факультетів ветеринарної медицини і 2-х науково-дослідних інститутів України, що підтверджено відповідними актами.

**Ключові слова:** тромбоцити, PRP, PRF, центрифуги, гістоструктура, фактори росту, маркери кісткового метаболізму, білки гострої фази, репаративний остеогенез, остеосинтез, регенеративна медицина, кролі, собаки.



## SUMMARY

Shevchenko S.M. Clinical and experimental substantiation of platelet concentrates' implantation and their composites with calcium phosphate ceramics due to bone fractures in dogs. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for the scientific degree of Philosophy Doctor in the specialty 211 – Veterinary medicine (21 – Veterinary medicine). – Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, 2023.

The effect of implantation into the interfragmentary spaces of platelet-rich various forms autofibrin and its composite with calcium phosphate ceramics for osteoreplacement on reparative osteogenesis has been clinically and experimentally substantiated. This is novel in solving the optimizing consolidation problem of long tubular bones' various types fractures in animals.

With the help of clinical-radiological, macro- and histomorphological methods of research and data analysis of hematological, biochemical and molecular-biological indicators, it has been proven that platelet concentrates after implantation in bone defects realize their osteoinductive properties with the beginning of neoangiogenesis and the formation of an early osteoblastic reaction. During composite osteoreplacement, similar processes occur in lamellar bone tissue. This course of reparative osteogenesis is confirmed by reactive thrombocytosis, phase peaks of nitric oxide and biochemical markers of bone metabolism, elimination of the imbalance between osteoresorptive and osteogenic processes.

The cytological and histological studies results established areas of platelet concentration in PRP and PRF samples at different values of the relative centrifugal centrifugation force. In particular, in the range of 100–1843 g of centrifugal centrifugation force in blood samples, the highest concentration of platelets in the obtained rabbit plasma is achieved for 100 g for 3 min –  $824 \pm 30.4$  G/l, and 400 g (10 min) –  $550 \pm 21.2$  G/l, for their content in whole blood –  $210 \pm 9.6$  G/l ( $p < 0.001$ ). At the same time, with an increase in this value, the content of platelets in the blood plasma decreases sharply within 10 minutes: from  $322 \pm 18.8$  G/l for 735 g to

20±4.5 G/l for 1843 g (p<0.001).

Different values of the relative centrifugal force of blood centrifugation also significantly affect the distribution of cellular elements in fibrin clots. As the centrifugation parameters increase, areas of platelet concentration shift toward the erythrocyte mass. In addition, when centrifuging blood samples in the range of 100–1843 g of centrifugal force, the length of fibrin clots increases with a uniform distribution of platelets in fibrin clots obtained at 400 g. This justifies the optimal modes of blood samples centrifugation in the range of 100–400 g to obtain platelet-rich plasma or fibrin.

For the first time, a clinical and radiological study established that the implantation of PRP materials in rabbits' bone defects of compact or cancellous bone is characterized by early peri- and endosteal reactions as well as the osteoid's formation with varying degrees of radiopacity, compared to their healing under a blood clot. Moreover, in the case of osteoreplacement with the PRF+HA/β-TCP–700 composite, an early and powerful development of osteogenic processes is observed, which occurs mainly due to endosteum with point osteosclerosis already on the 21st day. However, when xenogenic PRF is implanted into bone defects of rabbits, the inflammatory-resorptive processes are prolonged in time, which inhibits the osteogenic reaction, and the X-ray negativity of the bone defect is established even on the 42nd day with a zone of increased X-ray density around it.

Currently, the point macromorphological assessment of bone regenerates based on their volume, density and degree of contact with the parent bone actually did not depend on the substance of the bone tissue - spongy or compact. Upon that, with the implantation of auto-PRF or composite osteoreplacement, the macromorphological indicators of the bone regenerates' density and their connection with the mother bone are 1.3–1.4 and 1.3–1.8 times higher than those of controls, respectively. In addition to the above, reparative osteogenesis in rabbits after auto-PRF materials' implantation into bone defects is histomorphologically characterized by an earlier osteoblastic reaction with the formation of cancellous bone tissue elements on the 14th day and osteons on the 42nd. In the case of xeno-PRF

implantation, an excessive and prolonged chondroid reaction is observed up to the 42nd day, while in the case of composite osteosubstitution – an earlier osteoblastic reaction and neoangiogenesis on the 14th day with the formation of lamellar bone tissue's elements and, in particular, within the granules of by their gradual biodegradation and the osteons' formation during the 21st day. By scoring the histological criteria of bone regenerates on the 42nd day, the type of newly formed tissue, the volume of trabeculae and osteons, the density of placement and the number of cells in their thickness and on the surface does not depend on the type of spongy or compact substance of lamellar bone tissue. However, during the implantation of xenological PRF, its indicators on the 42nd day of reparative osteogenesis were 1.3–1.4 times lower than in the control group ( $p < 0.001$ ). On the other hand, during the implantation of autologous i-PRF, PRF or composite PRF osteosubstitution with calcium-phosphate ceramics, they were larger in 1.1–1.2 ( $p < 0.01–0.001$ ), 1.3 ( $p < 0.001$ ) and 1.3–1.4 ( $p < 0.001$ ) times respectively, which proves their osteoinductive and osteointegration properties.

Therefore, based on a combination of clinical and radiological, macro- and histomorphological studies, the following pattern was established regarding the degree of PRP materials' influence on the course of reparative osteogenesis in rabbits with model fractures of cancellous and compact bones: PRP < i-PRF < PRF < PRF+HA/ $\beta$ -TCP.

Notably, it was established that the PRP materials' implantation of different types into rabbits' bone defects is accompanied by moderate and rapid erythrocytopenia during the first 7 days of reparative osteogenesis, which is less pronounced in the groups using auto-PRF materials, but not xenological ones. During this period, a moderate decrease in the hemoglobin concentration in the blood occurs within the physiological norm. Furthermore, the complex application of PRF+HA/ $\beta$ -TCP–700 is accompanied by a significantly higher level of erythrocytes in the blood during the 14th–42nd day of reparative osteogenesis. Reactive thrombocytosis also develops, especially expressed during the 7–14th day in the case of using PRF and with peaks on the 3rd and 14th day for the PRF+HA/ $\beta$ -

TCP-700 composite osteosubstitution, which is evidence of their components' effect on bone regeneration.

Bone metabolism in rabbits according to the level of bone biochemical markers' activity in blood serum in the case of implantation into bone defects of PRF materials or their composite form is characterized by an early, already on the 3rd day, increase in the activity of bone alkaline phosphatase, followed by its peak on the 14th, and for osteoreplacement with a PRF-compatible ceramic composite – on the 7–14th and 42nd days, which reflects the osteogenesis processes' intensity and early remodeling of bone regenerates, which are moderate for PRP implantation. Whereas, in cases of healing under a blood clot and with the use of xeno-PRF, they are delayed in time (21–42 days) and, according to the dynamics of the general alkaline phosphatase's activity, contain a significant inflammatory-resorptive component. In general, it has been proven that, according to the level and phase of dynamic changes in the bone alkaline phosphatase's activity, autologous PRF exerts a significant influence on the intensity of osteogenesis processes, which in the case of its combination with bone substitute material acquire a powerful manifestation, and this, in particular, indicates the osteoinductive properties of PRF. The healing of bone defects in rabbits is also characterized in the early (on the 3rd–7th day) post-traumatic period by osteoresorption with an increase in the activity of its marker tartrate-resistant acid phosphatase by 3.5–3.7 times ( $p < 0.001$ ). At the same time, in the control group and with xeno-PRF implantation, it has a moderate and permanent state, and with the use of auto-PRF or composite osteoreplacement, it has another peak with an increase of 2.7–3.5 times ( $p < 0.001$ ) at 42nd day, which reflects a dynamic change in the stages of reparative osteogenesis. While, composite osteoreplacement with calcium-phosphate ceramics with PRF according to the biphasic increase in the Peterson index and the lowest phosphatase index in the period of 7–21 days is accompanied by an active redistribution of macroelements, intensive osteogenesis and moderate osteoresorption during remodeling of the bone regenerate, which generally ensures optimized consolidation of the model fracture.

Apart from that, it was established that the acute phase reaction after implantation of PRP materials into bone defects of rabbits is characterized by biphasic haptoglobinemia on the 3rd and 14th day, which first reflects the formation of the inflammatory-resorptive stage, and then the molecular-cellular mechanisms of connective tissue and cartilaginous callus replacement bone tissue. It is less intensively expressed with the use of PRF and composite osteosubstitution (an increase of only 1.1–1.2 times, and in the rest of the cases by 1.3–1.5 times,  $p < 0.001$ ) and is accompanied by positive dynamics with the implantation of PRP materials serum level of total protein, increasing albumin concentration in the early post-traumatic period. At the same time, the healing of defects of tubular bones in rabbits under a blood clot is accompanied by a permanent increase in the level of nitric oxide in the blood, reaching a peak value on the 14th day of reparative osteogenesis, followed by a decrease and a moderately increased concentration on the 21st day. During PRP implantation, it is characterized by a moderate increase during all periods of the study with a high peak value on the 14th day. After implantation of autologous PRF and i-PRF, high levels of nitric oxide of permanent manifestation were established with biphasic peaks on the 3rd and 21st and 42nd days, respectively, while with xenologous PRF there was a permanent moderate increase. However, osteoreplacement of bone defects in the 5th experimental group (PRF+HA/ $\beta$ -TCP–700) was accompanied by two peaks of the nitric oxide level - on the 14th and 42nd days, which is a reflection of intensive neoangiogenesis and, accordingly, remodeling of the bone regenerate.

Additionally, it was established that the consolidation of long tubular bones' fractures in dogs after periosteal osteosynthesis is accompanied by prolonged erythrocytopenia and leukocyte reaction during 42 days. In the early post-traumatic period, the level of total protein and albumin remains within the physiological norm, but with a certain tendency to the formation of hypoalbuminemia. In the case of PRF-implantation or composite osteoreplacement, this phenomenon is fleeting and less intense. Beyond that, a permanent increase in haptoglobin not only reflects the intensity of the inflammatory-resorptive stage, but also indicates its participation in

reparative osteogenesis as a carrier of hemoglobin. Currently, a hypercoagulable syndrome develops with a deficiency of antithrombin activity (up to the 21st day), which with PRF osteoimplantation or composite osteoreplacement is eliminated on the 21st, 14th, 7th, and 14th days, respectively, without changes in the concentration of the immunoregulatory inhibitor  $\alpha_2$ -macroglobulin. On top of all, it was established that the elevated level of nitric oxide in blood serum during periosteal osteosynthesis of tubular bone fractures in dogs was maintained during the first 7 days of reparative osteogenesis. With the use of implant materials, its level increased by 1.5–1.9 times ( $p < 0.001$ ) in the period from the 7th to the 42nd day with peaks on the 21st day for PRF implantation and on the 7th and 21st day during composite osteoreplacement, which reflects their osteoinductiveness and intensity of neoangiogenesis at different stages of reparative osteogenesis.

Consolidation of long tubular bones' fractures in dogs under osseous osteosynthesis is accompanied by peaks of serum total alkaline phosphatase activity on the 3rd and 21st days with a significantly lower level and normalization on the 42nd day in the case of PRF materials. To add to this, there is a permanent increase in the activity of its bone isozyme, a marker of osteogenesis, with a peak on the 21st and 14th days, respectively, after i-PRF or PRF implantation, and on the 7th–14th day after composite osteoreplacement. The peak activity's formation of tartrate-resistant acid phosphatase during osseous osteosynthesis was established on the 42nd day, on the 21st–42nd day – with additional implantation of PRF materials, and on the 14th–21st day – with composite osteoreplacement. This indicates an early osteoblastic reaction, a lower and optimized level of osteoresorptive processes, early remodeling of bone regenerate, which is also consistent with the dynamics of redistribution within the bone system of Ca and P by changing the value of their ratio.

For the first time, it has been proven that the implantation of i-PRF or PRF in the interfragmentary spaces for non-fragmentary and osteoreplacement with calcium phosphate ceramics with PRF for fragmented fractures of long tubular bones in dogs accelerates the consolidation of such fractures. In these conditions, X-ray imaging

and dynamics of bone metabolism's biochemical markers testify to a lower level of inflammatory-resorptive processes in the area of bone trauma and early and dynamic formation of bone regenerate due to endosteal osteogenesis, especially in the case of composite osteoreplacement.

The PRF materials' implantation and a composite of calcium-phosphate ceramics with PRF for osteoimplantation in the case of non-comminuted and comminuted long tubular bones' fractures in dogs in order to optimize and accelerate their consolidation is justified and proposed, which was approved and confirmed by relevant acts on implementation in a number of small pet clinics of Ukraine. Methodological recommendations were developed and approved by Protocol №10 of June 26, 2022 at the meeting of the Scientific Council of the Faculty of Veterinary Medicine of the Bila Tserkva State University: S.M. Shevchenko, M.V. Rublenko. Application of PRP technologies in veterinary medicine. Bila Tserkva: BNAU, 2022. 23 p.

The thesis materials are used during the study of the disciplines «General and special veterinary surgery», «Traumatology and orthopedics of small domestic animals», «Veterinary surgery», «Diseases of dogs and cats», «Small animals' diseases», «Surgical diseases of animals with anesthesiology» at the faculties of veterinary medicine of higher educational institutions and in scientific researches of 6 faculties of veterinary medicine and 2 research institutes of Ukraine, which is confirmed by relevant acts.

**Key words:** platelets, PRP, PRF, centrifuges, histostructure, growth factors, bone metabolism markers, acute phase proteins, reparative osteogenesis, osteosynthesis, regenerative medicine, rabbits, dogs.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Статті у наукових фахових виданнях України:*

1. **Shevchenko S., Rublenko M., Bonkovsky O.** Technologies for producing platelet masses for regenerative medicine. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2019. № 2. С. 105–117. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2019-152-2-105-117> (здобувач провела пошук та аналіз літератури, 1,5 д.а.).
2. **Шевченко С. М.** Динаміка гематологічних показників, макроморфологічна і рентгенологічна картини репаративного остеогенезу в кролів за використання тромбоцитарних концентратів та гідроксиапатитної кераміки. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2020. № 1. С. 153–164. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-153-164> (здобувач організувала проведення дослідів, виконала гематологічні, макроморфологічні та рентгенологічні дослідження, 1,3 д.а.).
3. **Шевченко С. М.,** Рубленко М. В. Гістологічна характеристика згустків фібрину, збагачених тромбоцитами і одержаних за різних режимів центрифугування крові. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2020. Т. 22. № 99. С. 84–93. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9914> (здобувач організувала проведення дослідів, виконала цитологічні та гістологічні дослідження, 1,1 д.а.).
4. **Шевченко С. М.,** Рубленко М. В., Ульянович Н. В., Клименко П. П. Гістоморфологічна характеристика остеозаміщення у кролів гідроксиапатитною керамікою та фібрином, збагаченим тромбоцитами. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2021. Т. 23. № 102. С. 43–52. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10207> (здобувач організувала проведення дослідів, виконала гістологічні дослідження, 1,1 д.а.).
5. **Шевченко С. М.,** Рубленко М. В. Динаміка гематологічних показників і реакції гострої фази за остеозаміщення аутофібрином та гідроксиапатитною керамікою з  $\beta$ -трикальційфосфатом осколкових переломів кісток у собак. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2022. № 1.



C. 188–199. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-188-199> (здобувач організувала проведення дослідів, виконала екстракортикальний остеосинтез, провела гематологічні дослідження, 1,4 д.а).

6. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Клініко-рентгенологічне та патохімічне обґрунтування остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою з  $\beta$ -трикальційфосфатом та аутофібрином, збагаченим тромбоцитами, за осколкових переломів кісток у собак. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2022. Т. 24, № 106. С. 87–96. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10614> (здобувач організувала проведення дослідів, виконала рентгенологічні та біохімічні дослідження, 1,0 д.а).

**Статті в іноземних виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

1. **Shevchenko S.**, Rublenko M. The effect of osteosubstitution by platelet-rich autofibrin and hydroxyapatite ceramic with  $\beta$ -tricalcium phosphate on biochemical parameters of blood in rabbits. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2022. Vol. 46. No. 4. P. 599–608. Doi: <https://doi.org/10.55730/1300-0128.4231> (Scopus) (здобувач організувала проведення дослідів, провела відбір зразків крові, виконала біохімічні дослідження, 1,02 д.а).

**Матеріали науково-практичних конференцій:**

1. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Вплив різних режимів центрифугування на концентрування клітин крові у згустках фібрину, збагаченого тромбоцитами. *Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини та технології тваринництва*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 31 жовтня 2019 р.). Біла Церква, 2019. С. 100–103 (здобувач організувала проведення дослідів, виконала гістологічні дослідження, 0,15 д.а).

2. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Характеристика впливу фібрину, збагаченого тромбоцитами, на репаративний остеогенез у кролів. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології*

*тварин*: матеріали щоріч. наук.-практ. конф. Молодих вчених (9 липня 2020 р., ІВМ НААН, м. Київ). Київ: ЦП «Компринт», 2020. С. 38–39 (здобувач організувала проведення дослідів, виконала гематологічні та рентгенологічні дослідження, 0,07 д.а).

3. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Порівняльна оцінка біохімічних змін крові кролів за використання ін'єкційного фібрину, збагаченого тромбоцитами для заміщення кісткових дефектів. *II конференція сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу "Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові: тези доповідей*, м. Львів, (18–19 листопада 2021 р.) / ЛНУВМБ ім. С.З. Гжицького, 2021. С. 175–176 (здобувач організувала проведення дослідів, виконала біохімічні дослідження, 0,08 д.а).

4. Рубленко М. В., **Шевченко С. М.**, Рубленко С. В. Оцінка кісткового метаболізму за доклінічних випробувань «остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою та збагаченим тромбоцитами фібрином» *Державна Фармакопея України — Європейська якість вітчизняних лікарських засобів* : матеріали наук.-практ. конф., м. Харків, 25–26 листоп. 2021 р. С. 96–98 (здобувач організувала проведення дослідів, виконала біохімічні дослідження, 0,1 д.а).

5. Рубленко М., Андрієць В., **Шевченко С.**, Ульянович Н., Фірстов С., Коломієць В. Загоєння кісткових дефектів кролів у випадку комбінованого застосування гідроксиапатитної кремній-легованої кераміки та аутологічного тромбоцитарного фібрину. *Державна Фармакопея України — Європейська якість вітчизняних лікарських засобів*: матеріали наук.-практ. конф., м. Харків, 25–26 листоп. 2021 р. С. 98–101 (здобувач проводила відбір крові та приготування аутологічного тромбоцитарного фібрину, 0,25 д.а).

6. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Власенко В. М. Оцінка гострофазної реакції за остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою і аутофібрином, збагаченим тромбоцитами, за переломів кісток у собак. *Зміна*

*парадигми сучасної науки після військового вторгнення рф на територію незалежної України: матеріали міжнар. наук.-практ. конф. 22–23 червня 2022 р (Румунія, Словаччина). С. 144–146 (здобувач організувала проведення дослідів, виконала біохімічні дослідження, 0,12 д.а).*

7. **Шевченко С. М.,** Рубленко М. В., Власенко В. М. Динаміка маркерів кісткового метаболізму за остеозаміщення переломів кісток у собак кальцій-фосфатною керамікою та збагаченим тромбоцитами аутофібрином. *ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я-2022: матеріали конференції, м Київ, 22–24 вересня 2022 р. С. 123–124 (здобувач організувала проведення дослідів, виконала біохімічні дослідження, 0,1 д.а).*

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	38
1.1. Ключові молекулярно-біологічні механізми регенеративних властивостей кісткової тканини	38
1.2. Принципи і засоби регенеративної медицини	45
1.3. PRP-технології: біологічні, технологічні та клінічні аспекти застосування у ветеринарній медицині	51
1.3.1. Біологічні властивості тромбоцитів і фібрину	51
1.3.2. Методики отримання плазми, збагаченої тромбоцитами	54
1.3.3. Методики отримання фібрину, збагаченого тромбоцитами	59
1.3.4. Використання PRP-технологій у ветеринарній медицині	62
1.4. Висновок з огляду літератури	68
РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ	70
2.1. Методологія та схеми досліджень	70
2.2. Характеристика використаних матеріалів та методи дослідження	85
РОЗДІЛ 3. ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЖИМІВ ЦЕНТРИФУГУВАННЯ ЗА ОДЕРЖАННЯ ЗБАГАЧЕНИХ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ ТА ФІБРИНУ	95
3.1. Цитологічне дослідження плазми і макроморфологія фібринових згустків одержаних за різних режимів центрифугування крові	95
3.2. Гістоморфологічна характеристика PRF, одержаного за різних величин відцентрової сили центрифугування крові	100
РОЗДІЛ 4. КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВПЛИВУ PRP І РІЗНИХ ТИПІВ PRF ТА ЇХ КОМПОЗИЦІЇ З КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНОЮ КЕРАМІКОЮ НА РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ У КРОЛІВ	109

4.1. Динаміка клініко-рентгенологічних змін	109
4.2. Макроморфологічне дослідження кісткових регенератів	120
4.3. Гістоморфологічна оцінка регенератів кісткової тканини	134
4.4. Динаміка гематологічних показників	167
4.5. Біохімічні показники	175
4.5.1. Динаміка маркерів кісткового метаболізму	175
4.5.2. Динаміка показників гострої фази	189
РОЗДІЛ 5. КЛІНІКО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ PRP-ТЕХНОЛОГІЙ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЙ З КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНОЮ КЕРАМІКОЮ У ЛІКУВАННІ ПЕРЕЛОМІВ ДОВГИХ ТРУБЧАСТИХ КІСТОК У СОБАК	201
5.1. Динаміка клініко-рентгенологічних критеріїв	201
5.2. Динаміка гематологічних та біохімічних показників	210
5.2.1. Гематологічні показники	212
5.2.2. Показники кісткового метаболізму	215
5.2.3. Динаміка показників гострої фази у собак	223
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	233
ВИСНОВКИ	247
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	252
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	254
ДОДАТКИ	294

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

PRP (Platelet-Rich Plasma) – плазма, збагачена тромбоцитами

PRF (Platelet-Rich Fibrin) – фібрин, збагачений тромбоцитами

I-PRF (Injectable-Platelet-Rich Fibrin) – ін'єкційний фібрин, збагачений тромбоцитами

P-PRP (Pure Platelet-Rich Plasma) – чиста плазма, збагачена тромбоцитами

L-PRP (Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma) – плазма, збагачена лейкоцитами та тромбоцитами

P-PRF (Pure platelet-rich fibrin) – чистий фібрин, збагачений тромбоцитами

L-PRF (Leukocyte and platelet-rich fibrin) – фібрин, збагачений лейкоцитами та тромбоцитами

A-PRF (Advanced platelet-rich fibrin) – «розширена» форма фібрину, збагаченого тромбоцитами

T-PRF (Titanium platelet-rich fibrin) – фібрин, збагачений тромбоцитами, одержаний у титанових пробірках

PDGF – фактор росту тромбоцитів

TGF- $\beta$  – трансформуючий фактор росту бета

FGF – фактор росту фібробластів

IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту-1

IGF-2 – інсуліноподібний фактор росту-2

VEGF – судинно-ендотеліальний фактор росту

EGF – епідермальний фактор росту

IL-8 – інтерлейкін-8

KGF – фактор росту кератиноцитів

CTGF – фактор росту сполучної тканини

RCF – (relative centrifugal force) – відносна відцентрова сила (g)

HA/ $\beta$ -TSP-700 – гідроксиапатит з  $\beta$ -трикальційфосфатом, розмір гранул 700 мкм

NO – оксид азоту

ЗЛФ – загальна лужна фосфатаза

КЛФ – кістковий ізофермент лужної фосфатази

ТрКФ – тартрат-резистентна кисла фосфатаза

Са – кальцій

Р – фосфор

АТ-III – антитромбін – III

РФ – розчинний фібрин

$\alpha_2$ -М –  $\alpha_2$ -макроглобулін

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Нозологічні форми травматологічного і ортопедичного профілю займають суттєву частку як у структурі хірургічної патології, так і захворюваності тварин-компаньйонів (собак, кішок і екзотичних) у цілому. Це зумовлено їх досить великими популяціями серед різних верств населення, в тому числі в Україні, розширенням можливостей за кістково-суглобової патології діагностичної візуалізації, анестезіологічного забезпечення, використання високотехнологічних матеріалів і способів у лікуванні з одночасним збільшенням вимог щодо добробуту тварин [1–8].

При цьому досить складною в патофізіологічному, клінічному та оперативно-технологічному аспектах залишається патологія кісткової тканини травматичного, метаболічного і неоплазійного генезу [1, 9–11].

Нажаль, в Україні дослідження щодо її моніторингу проводяться в досить невеликих об'ємах, не мають системного характеру і стосуються, головним чином, лише кісткових травм. Це не дозволяє мати достатньо об'єктивної оцінки поширеності окремих нозологічних форм у межах анатомо-топографічних ділянок та залежно від біомеханіки травматичних ушкоджень чи типу неоплазійного процесу або ж характеру метаболічних порушень кісткової тканини. У низці робіт [7, 9, 11–15, 16] висвітлено аналіз хірургічної патології опорно-рухового апарату в залежності від виду тварин, етіологічного чинника, анатомо-топографічної локалізації та біомеханіки переломів кісток.

Зокрема, в Україні, за моніторингу хірургічної патології у дрібних домашніх тварин встановлено [1, 11, 13, 15, 17], що випадки травм досягають 50–80 %, з яких кістково-суглобова патологія становить 15–32 %. Нещодавно представлено [18] структуру осколкових переломів у собак у відповідності до міжнародної класифікації OASIF, за якої відображено біомеханічну складову переломів кісток, проведена їх типізація, що дозволяє обрати оптимальну стратегію і тактику лікування.



Водночас зарубіжні дослідники більш об'єктивно висвітлюють результати моніторингу патології опорно-рухового апарату за нозологічними формами як у видовому розрізі, так із урахуванням етіологічних чинників, породних або популяційних факторів, ареалу її поширення, ефективності лікування та характеру можливих ускладнень. Так, за інформацією [9, 19–24] переломи у дрібних домашніх тварин становлять 1,14–15 % від усього загалу захворювань опорно-рухової системи, а з них 76 % – це фрактури довгих трубчастих кісток. Також виділяють низку нозологічних форм, розвиток яких пов'язаний з генетичною схильністю до порушень чи з аліментарним або ж з гормональним дисбалансом метаболічних процесів у кістковій тканині: розриви хрестоподібних зв'язок з ускладненням на рівні 3–34 % [25–27]; гіпертрофічна остеодистрофія; паностити; остеохондрози; хвороба Легга-Кальве-Пертеса або аваскулярний некроз головки стегнової кістки, яка у 12–16 % випадків уражує обидві кінцівки; дисплазія кульшових 8,8–49,2 % та ліктьових суглобів – 0,7 % [28, 29, 30], а у кішок вона зустрічається у 6,6 % випадків [31]; вивих надколінника, за якого ускладнення після оперативного лікування виникають у 13–18 %; власне переломи [19–21], у структурі яких виділяють і переломи кісток тазу, що варіюють у собак та котів у межах 20–30 % від усіх травм опорно-рухового апарату [32]. У будь-якому разі зазначених нозологічних форм чи в преморбідному, чи в постморбідному періодах має місце порушення або ж втрата остеорегенеративного потенціалу.

При цьому з урахуванням генетико-біологічних і фізіологічних факторів (породи, віку та статі) структура фрактур виглядає наступним чином [20, 22, 24]. Частіше переломи трапляються у німецьких вівчарок – 74,41 %, у тварин до одного року – 33–80,62 % та самців – 52–62 %. За анатомо-топографічною локалізацією серед загалу кісткових травм переломи тазових кінцівок складають 48,06 %, грудних – 28,68 %, кісток тазу – 20,16 %, нижньої щелепи – 3 %, хребців – 2,36 %. Серед довгих трубчастих кісток переломи стегнових становили 22–35,5 %, великогомілкових – 15,5–28,9 %, передпліччя – 11,63–18,34 %, плечової кістки – 7,5–10,08 %, переломи дистальних відділів кінцівок

– 4,7–36 % випадків [20, 23]. При цьому травмування у ділянці діафіза зустрічається у 73 % випадків [19]. Також проаналізовано [2, 11, 15, 20, 33] частоту використання різних методів фіксації для відновлення структури і функції кісток: накладання гіпсової пов'язки – 79,84 %, зовнішня фіксація – 22,33 %, накістковий остеосинтез – 18,45 %, інтрамедулярний остеосинтез – 14,56 %, використання серкляжу – 1,94 %. Однак рівень ускладнень після такого лікування залишається досить високим – 5–18 %.

Надзвичайно складними за біомеханікою травми, високим ступенем втрати репаративного потенціалу кісткової тканини і частотою ускладнень вважаються [34, 35, 36] осколкові переломи, частка яких може складати – 18,75–60 % [10, 15, 18]. Наявність кісткового дефекту в зоні перелому зумовлює нестабільність остеосинтезу через зменшення площі контакту між кістковими уламками. Консолідація таких переломів ускладнюється додатковою травмою великого масиву м'яких тканин, їх розміщенням та просоченням кров'ю з високим ризиком інфікування і розвитку травматичного ендотоксикозу та подовженням стадій репаративного остеогенезу на підґрунті явищ дисрегенерації. Саме за таких переломів найчастіше виникають різноманітні ускладнення у формі незрощень, псевдосуглобів, контрактур, остеомієлітів, частка яких може складати – 7–32 % [11, 33, 37–39]. Поряд з цим значні об'єми кісткової тканини втрачаються за ендопротезування, яке поступово запроваджується у ветеринарну ортопедію. При цьому стабільність ендопротезних імплантів істотною мірою залежить від ступеня їх остеointegraції, яка нерідко є недостатньою, що призводить до різноманітних ускладнень і неспроможності ендопротезів [17, 40].

Водночас, незважаючи на буденність різних способів остеосинтезу, частота ускладнень у тварин залишається досить високою – 13,6–61 % [20, 21, 41].

При цьому проблема остеодисрегенерації частково вирішується шляхом фармакологічної корекції репаративного остеогенезу [42–44]. Однак вона

неспроможна кардинально відновити репаративний остеогенез без остеозаміщення у разі значних кісткових дефектів [24, 35, 40].

Завдяки досягненням біоінженерії для їх заміщення запропоновано низку різноманітних матеріалів з різними біологічними чи фізико-хімічними характеристиками, при чому принциповими вимогами до них є біосумісність, здатність до остеокондуктивності, остеointegraції, osteoіндуктивності та біорезорбції [7, 33, 45–47].

Водночас, хоча губчаста аутокістка вважається [48] «золотим стандартом» остеозаміщення, оскільки є джерелом мезенхімальних остеогенних стовбурових клітин, але вона також має ряд недоліків. Зокрема, це недостатній її об'єм та ризик інфікування при одержанні матеріалу, додаткова травма у ділянці його забору, нерідко неспроможність отримання кісткового аутоімпланта за життєвими протипоказаннями пацієнта [33, 47].

Нині для остеозаміщення розробляються і обґрунтовуються цілі групи матеріалів, що різняться за походженням, структурою, фізико-хімічними і біологічними властивостями: метали; синтетичні полімери; керамічні, у тому числі кальцій-фосфатні; біоскло; біосітали; склокераміка; вуглецеві; колагенові та неколагенові білки, демінералізований кістковий матрикс тощо. Серед них найбільш перспективною для широкої клінічної практики вважається [49–52] кальцій-фосфатна кераміка чи матеріали на основі гідроксиапатиту. Це група біосумісних композитних матеріалів, яка подібна за складом до мінерального компоненту кісткової тканини і має виражені остеокондуктивні та osteointegraційні властивості. Для надання їм антибактеріальних, osteoіндуктивних, протипухлинних чи інших властивостей пропонується їх легування різними йонами: магнію, міді, алюмінію, стронцію, кремнію, германію [33, 40, 53–56].

Проте, хоча нелеговані кальцій-фосфатні матеріали для остеозаміщення володіють вираженими остеокондуктивними і osteointegraційними властивостями, однак вони не мають прямої та безпосередньої osteoіндуктивної дії [33, 45, 46].

Цей недолік може бути заповненим засобами регенеративної медицини, зокрема: шляхом поєднання остеозаміщувальних імплантів з мезенхімальними стовбуровими клітинами [3, 4, 57–60], кістковими морфогенетичними білками та PRP-матеріалами першого чи другого покоління, факторами росту [61–63].

Відомо [64–66], що формування гематоми за більшості нозологічних видів переломів є ключовим тригерним пусковим чинником репаративного остеогенезу, оскільки вона є джерелом остеогенних клітин і факторів росту (PDGF, VEGF, TGF- $\beta$  та інші). Поряд з цим фрактурна гематома сприяє остеорепації через формування первинної фібриноретикулярної матриці з наступною її інфільтрацією ендотеліальними клітинами та фібробластами, утворенням нових капілярів та синтезом матричного колагену. У результаті цього кістковий регенерат поступово заміщує кров'яний згусток міжвідламкового простору. Порушення послідовності чи переривання цього процесу зумовлює зниження остеорепаративного потенціалу [45, 67, 68].

Зокрема, під час проведення репозиції кісткових уламків та їх остеосинтезу, особливо за осколкових переломів, відбувається руйнування згустку гематоми та його видалення разом із кістковими осколками [64, 69, 70].

Цілком передбачуваним є те, що включення до кальцій-фосфатних матеріалів структурних елементів «природної гематоми» може надати їм суттєвих остеогенних властивостей та відновити процеси репаративного остеогенезу, що властиво для продуктів PRP-технологій. Останні передбачають застосування тромбоцитарних мас, які містять велику кількість різноманітних факторів росту, що вивільняються з активованих альфа-гранул тромбоцитів. Найбільш вивченими з них є фактор росту тромбоцитів (PDGF), трансформуючий фактор росту бета (TGF- $\beta$ ), фактор росту фібробластів (FGF), інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1) та 2 (IGF-2), судинно-ендотеліальний фактор росту (VEGF), епідермальний фактор росту (EGF) та Інтерлейкін 8 (IL-8), фактор росту кератиноцитів (KGF) та фактор росту

сполучної тканини (CTGF), які створюють остеоіндуктивний ефект щодо остеогенних кісткових клітин і забезпечують, притаманний для кісткової тканини, клітинний тип регенерації [39, 48, 65, 67, 69].

Серед тромбоцитарних концентратів, розрізняють два типи: першого покоління – плазма, збагачена тромбоцитами (PRP – Platelet-Rich Plasma); другого – фібрин, збагачений тромбоцитами (PRF – Platelet-Rich Fibrin) [71–74]. В основу їх класифікації закладено два основні параметри, такі як архітектура фібрину та вміст клітин. В залежності від цього, тромбоцитарні концентрати можна розділити на 5 основних категорій: чиста плазма, збагачена тромбоцитами (Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP)) або плазма збагачена факторами росту (Plasma Rich in Growth Factors (PRGF)); плазма, збагачена лейкоцитами та тромбоцитами (Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma (L-PRP)); ін'єкційний фібрин, збагачений тромбоцитами (injectable-Platelet-Rich Fibrin (i-PRF)); чистий фібрин, збагачений тромбоцитами (Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF)), комерційна назва Fibrinet (технологія його виготовлення передбачає використання антикоагулянту); фібрин, збагачений лейкоцитами та тромбоцитами (Platelet-Rich Fibrin (L-PRF)) [75–78]. Вони різняться фізичними властивостями: рідкий та щільний компоненти, за клітинним вмістом, тобто присутністю тільки тромбоцитів або також і клітин лейкоцитарного ряду, наявністю фібринового каркасу, який виконує функцію матриці, тривалістю випуску факторів росту [75–79] від декількох годин до 10 днів, присутністю в їх складі антикоагулянтів та активаторів.

Об'єм публікацій, відносно використання фібрину в розробці кісткової тканини, невпинно збільшується. Однак їх результати досить розрізнені і повноцінність фібрину, збагаченого тромбоцитами, залишається суперечливою. Більшість протиріч в літературі є результатом використання різноманітних методик його ізоляції: часу та швидкості центрифугування крові, а отже різних механічних, біологічних властивостей та складу одержаних згустків, залежно від способів застосування.

Загалом, дослідження, що включають використання PRF, проведені лише на лабораторних тваринах [51, 80–83]. При цьому його використання в клінічній практиці зустрічається тільки в незначному об'ємі публікацій [84–87]. За аналізу таких досліджень виявляється, що часто не завжди детально описана методика одержання PRF – параметри часу та швидкості центрифугування, не вказаний тип центрифуги, що не дає інформації про горизонтальне розташування пробірки чи під кутом під час процесу центрифугування, не проводиться встановлення клітинного складу одержаного матеріалу, не вказується ділянка згустку, яку використовували тощо. Також маловідомим є застосування PRF за різних нозологічних типів переломів [5, 26, 46, 61–63, 87–89].

Будучи потужним остеоіндуктором аутогенна тромбоцитарна маса не володіє остеокондуктивними властивостями, що слугує підставою для проведення експериментів, в ході яких будуть застосовуватися різні остеокондуктивні матеріали. Водночас недостатньо уваги приділено вивченню та характеристиці гістоморфологічних особливостей репаративного остеогенезу різних видів кісткової тканини та ступеня остеointegraції різних видів біокомпозитних матеріалів [33, 37, 40, 90].

Отже, обґрунтування ефективності використання гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, для заміщення кісткових дефектів та вивчення особливостей репаративного остеогенезу різних видів кісткової тканини у тварин дозволить оптимізувати і прискорити консолідацію переломів.

Таким чином, вивчення впливу аутофібрину, збагаченого тромбоцитами, та його комбінації з гідроксиапатитом та  $\beta$ -трикальційфосфатом на підставі клініко-рентгенологічного, гістоморфологічного і біохімічного обґрунтування є актуальним, оскільки надасть можливість оптимізувати консолідацію переломів трубчастих кісток, у тому числі і осколкових, та зменшити частоту їх ускладнень у тварин, що є важливим для сучасної травматології та ортопедії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконувалась у межах програми з підготовки доктора філософії (2018–2022 рр.) та є складовою науково-дослідної роботи «Доклінічні дослідження виробів з розроблених біоматеріалів» (договір № 48/1 від 27.08.2019 р.) у межах завдань науково-технічної державної теми НАН України «Розробка та доведення до впровадження в клінічну практику кісткових імплантатів різного призначення з новітніх біоматеріалів для відновлення кісткової тканини та функції кісток після поранень в бойових діях» № 0119U102083, у якій дисертантка була виконавцем підрозділу.

**Мета роботи** – клініко-експериментально обґрунтувати імплантацію збагаченого тромбоцитами аутофібрину та його композиту із кальцій-фосфатною керамікою за переломів довгих трубчастих кісток у собак.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання:**

1) встановити на підставі цитологічного і гістоморфологічного дослідження зразків плазми крові та фібринових згустків оптимальні режими центрифугування крові для одержання тромбоцитарних концентратів та ділянки концентрування тромбоцитів у їх щільних формах;

2) дослідити вплив PRP і різних типів PRF та їх композиту з кальцій-фосфатною керамікою на репаративний остеогенез за модельних переломів довгих трубчастих кісток у кролів на підставі його клініко-рентгенологічної, макро- і гістоморфологічної оцінки;

3) вивчити динаміку гематологічних показників, біохімічних маркерів кісткового метаболізму, реакції гострої фази і ендотеліальної функції за імплантації різних форм PRP-матеріалів у кісткові дефекти та їх остеозаміщення композитом з кальцій-фосфатної кераміки і аутологічного PRF;

4) клініко-рентгенологічно обґрунтувати імплантацію i-PRF та PRF в міжуламковий кістковий простір за неосколкових та остеозаміщення

композитом кальцій-фосфатної кераміки з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак;

5) вивчити динаміку гематологічних показників, реакції гострої фази, показників гемостазу і ендотеліальної функції після накісткового остеосинтезу та додаткової імплантації і-PRF чи PRF в міжуламковий кістковий простір за неосколкових або ж остеозаміщення композитом кальцій-фосфатної кераміки з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак;

б) дослідити динаміку вмісту в сироватці крові Ca, P та їх співвідношення і біохімічних маркерів кісткового метаболізму після накісткового остеосинтезу та додаткової імплантації і-PRF та PRF в міжуламковий кістковий простір за неосколкових та остеозаміщення композитом кальцій-фосфатної кераміки з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак.

*Об'єкт дослідження* – модельні переломи у кролів та осколкові і неосколкові переломи довгих трубчастих кісток у собак.

*Предмет дослідження* – вплив імплантації різних форм PRP- матеріалів та композитного остеозаміщення гідроксиапатитної кераміки зі збагаченими тромбоцитами форми аутофібрину на репаративний остеогенез у тварин, його клініко-рентгенологічна, гістоморфологічна і патогенетична оцінка за переломів кісток у кролів і собак.

**Методи дослідження** – клінічні, рентгенологічні, макроморфологічні, гістологічні (фарбування гематоксиліном і еозином), гематологічні (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити), гемостазологічні (антитромбін-III, розчинний фібрин), біохімічні (гемоглобін, альбумін, загальний білок, кальцій, фосфор, активність загальної лужної фосфатази, її кісткового ізоферменту та тартратрезистентної кислої фосфатази, оксид азоту (NO), гаптоглобін,  $\alpha_2$ -макроглобулін), статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає у пріоритетному клініко-патогенетичному обґрунтуванні імплантації різних форм аутотромбоцитарних концентратів та остеозаміщення композитом



аутологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами, із кальцій-фосфатною керамікою для оптимізації консолідації переломів довгих трубчастих кісток у собак.

Встановлено, що найбільша концентрація тромбоцитів у плазмі крові за одержання різних форм збагаченого цими клітинами аутофібрину досягається за режимів центрифугування 100g – 3хв та 400 g – 10 хв, тоді як подальше збільшення величини його відцентрової сили супроводжується динамічним зменшенням їх умісту.

Доведено гістоморфологічно, що в діапазоні центрифугування 100–400 g відбувається рівномірний розподіл тромбоцитів у збагачених ними згустках аутофібрину.

Вперше в Україні доведено на підставі клініко-рентгенологічних, макро- і гістоморфологічних досліджень, що ступінь остеоіндуктивного впливу різних форм тромбоцитарних концентратів та композиту збагаченого тромбоцитами аутофібрину з кальцій-фосфатною керамікою за модельних переломів губчастої та компактної кісткової тканини у кролів виражається наступною закономірністю: ксенологічний PRF < PRP < i-PRF < PRF < PRF+HA/β-TCP–700. При цьому за імплантації ксенологічного PRF мають місце подовжені у часі та більш інтенсивні запально-резорбтивні явища і хондрійна реакція, тоді як за імплантації аутоPRF-матеріалів формуються рання остеобластична реакція з розвитком елементів губчастої кісткової тканини (14-а доба) та остеонів (42-а доба), що забезпечує прискорення репаративного остеогенезу залежно від форми тромбоцитарного аутофібрину в 1,2–1,3 раза з вираженою остеointegraцією регенерату в материнську кістку.

Доведено, що композитне остеозаміщення за модельних переломів у кролів поряд з ранньою остеобластичною реакцією супроводжується інтенсивним неоангіогенезом з формуванням елементів пластинчастої кістки вже на 14-ту добу і поступовою біодеградацією кальцій-фосфатної кераміки та утворенням остеонів (на 21-у добу), що прискорює виповнення кісткових

дефектів повноцінним регенератом в 1,3–1,4 раза за макроморфологічними і гістоморфологічними критеріями.

Встановлено, що гематологічним і патохімічним відображенням остеоіндуктивного впливу PRF-матеріалів на репаративний остеогенез у кролів є прискорене усунення посттравматичної еритроцитопенії та гіперкоагуляційного синдрому, реактивний тромбоцитоз упродовж 7–11-ої доби, менш інтенсивна реакція гострої фази, двохфазне підвищення в крові оксиду азоту як маркера неоангіогенезу, раннє, з піком на 14-ту добу, підвищення активності лужної фосфатази, яка превалює над ферментативною остеорезорбцією.

Доведено, що остеозаміщення PRF-умісним керамічним композитом у кролів супроводжується двохфазними піками вмісту в крові оксиду азоту, активності фосфатаз та їх співвідношення, індекса Ca : P, які відображають ранній і динамічний неоангіогенез, інтенсивний остеогенез на фоні помірної остеорезорбції з активним перерозподілом макроелементів у кістковій системі, що узгоджується з гістоморфологічною картиною репаративного остеогенезу і в цілому забезпечує оптимізовану консолідацію переломів.

Вперше у вітчизняній ветеринарній ортопедії доведено, що імплантація і-PRF чи PRF у міжуламкові простори за неосколкових та остеозаміщення композитом PRF з кальцій-фосфатною керамікою за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак скорочує терміни клініко-рентгенологічно підтвердженої їх консолідації в 1,3 та в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з використанням лише накісткового остеосинтезу, та супроводжується динамічним усуненням посттравматичної анемії, лейкоцитозу та гіперкоагуляційного синдрому.

Заразом встановлено, що патохімічна фаза репаративного остеогенезу за імплантації різних форм аутоPRF у ділянки переломів та композитного остеозаміщення характеризується вищими концентраціями в крові оксиду азоту, по-стадійними піками активності кісткового ізоферменту лужної фосфатази та тартратрезистентної кислоти фосфатази, які свідчать про ранній

ангіо- і остеогенез на фоні оптимізованої остеорезорбції, динамічне формування та ремоделювання кісткового регенерату.

**Практичне значення одержаних результатів** полягає у використанні обґрунтованих параметрів центрифугування зразків крові за одержання аутологічних PRP-матеріалів із достатньою концентрацією тромбоцитів для цілей регенеративної медицини у тварин і, зокрема для відновлення регенеративного потенціалу кісткової тканини шляхом імплантації в міжуламкові простори ін'єкційних чи щільних форм збагаченого тромбоцитами аутофібрину або ж остеозаміщення його композитом з кальцій-фосфатною керамікою, що отримало комплексне клініко-рентгенологічне, макро- і гістоморфологічне, гематологічне та патобіохімічне обґрунтування. Заразом розроблені бальні макро- і гістологічна оцінки перебігу репаративного остеогенезу можуть використовуватися в подальших клініко-експериментальних дослідженнях щодо об'єктивної оцінки репаративного остеогенезу в тварин.

Розроблені способи одержання тромбоцитарних концентратів та їх використання за переломів кісток пройшли клінічну апробацію в низці клінік дрібних тварин (додаток А2–А4).

Розроблені та затверджені до практичного використання методичні рекомендації: «Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині» (додаток А1, А9).

Матеріали дисертації та розроблені методичні рекомендації використовуються у навчальному процесі під час вивчення дисциплін «Загальна і спеціальна хірургія», «Хірургічні хвороби тварин з анестезіологією», «Ветеринарна хірургія», «Хвороби собак і котів», «Хвороби дрібних тварин», «Травматологія і ортопедія дрібних тварин» та у наукових дослідженнях (Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Харківська державна зооветеринарна академія, Одеський державний аграрний університет, Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Білоцерківський національний

аграрний університет, Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН, Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН Україна) (додатки А5–А8, А10–А12).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно виконано весь обсяг клініко-експериментальних досліджень, проведено статистичне оброблення одержаних результатів, їх аналіз та узагальнення. Клінічні, рентгенологічні, макро- і гістоморфологічні, гематологічні, гемостазологічні та біохімічні дослідження виконані в лабораторії кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету.

**Апробація матеріалів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися і були схвалені на міжнародних, державних наукових і науково-практичних конференціях: «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини та технології тваринництва» (м. Біла Церква, 31 жовтня 2019 р.); «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 9 липня 2020 р.), «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини» (м. Біла Церква, 21 жовтня 2021 р.); «II конференція сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові (м. Львів, 18-19 листопада 2021 р.); «Державна Фармакопея України – Європейська якість вітчизняних лікарських засобів» (м. Харків, 25-26 листопада 2021 р.); «ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я-2022» (22–24 вересня 2022 р.); «Зміна парадигми сучасної науки після військового вторгнення РФ на територію незалежної України» (Румунія, Словаччина, 22–23 червня 2022 р.).

Розроблені методичні рекомендації: «Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині».

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, зокрема 1 у виданні, включеному в міжнародну наукометричну базу даних Scopus, та 6 – у виданнях, що належать до переліку наукових видань України: науковому віснику ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету (3) та у віснику Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького (3), матеріалах і тезах конференції (7), науково-методичні рекомендації: «Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині» (1).

**Структура та обсяг дисертації.** Робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Вибір напрямів досліджень, матеріал та методи виконання роботи», 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та пропозицій виробництву, списку використаних джерел і 14 додатків. Основний текст дисертації викладено на 168 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 16 таблицями та 99 рисунками. Список використаних джерел містить 337 найменувань, у тому числі 289 – латиницею.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Ключові молекулярно-біологічні механізми регенеративних властивостей кісткової тканини**

В основі фізіологічних компенсаторно-приспосувальних процесів системи опорно-рухового апарату лежить ремоделювання. При цьому постійно відбуваються явища остеорезорбції та остеогенезу. Їх інтенсивність залежить від структурно-функціональних параметрів типу кісткової тканини (грубоволокниста чи пластинчаста), вікових та видових особливостей, біомеханіки та власне величини механічного навантаження на ту чи іншу ділянку кістки [68]. Встановлено [91, 92] за умов тривалого зменшення інтенсивності навантаження на кісткову тканину відбувається зниження мікроциркуляції, метаболічних процесів та активуються процеси остеорезорбції, що може призвести до зниження її маси. І навпаки, при збільшенні навантаження активується клітинна функція остеобластів, спрямована на процеси синтезу і компенсування дефіциту кісткової маси. Таким чином досягається стійка структурно-функціональна організація кістки [91, 93].

Ще один шлях відновлення кісткової тканини – репаративний остеогенез, який має дещо схожі молекулярно-біологічні процеси та гістоморфологічні складові з фізіологічним ремоделюванням, проте його завершення не завжди виявляється позитивним. Він має місце у випадках дії надмірної щодо кістки сили, яку вона здатна витримати, наслідком чого, зазвичай, є переломи. Загоєння ушкоджень кісткової тканини, на відміну від м'яких тканин – це процес, який не призводить до утворення рубців, а його кінцевим результатом є повне відновлення анатомічної структури кістки та її функції. Проте, перебіг та наслідки репаративного остеогенезу залежать від низки чинників: типу та локалізації фрактур, методів та матеріалів для остеосинтезу, біомеханіки переломів та їх репозиції, а також від

імунологічного, гормонального та метаболічного статусу організму з кістковою травмою. Від них залежить узгодженість молекулярно-біологічних механізмів репаративного остеогенезу, і, в першу чергу, ступінь індукції проліферативних механізмів, що зумовлюють диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин в остеогенні [94–97].

Концепції сучасного погляду [98, 99] на репаративний остеогенез полягають у тому, що остеогенні процеси забезпечуються не тільки клітинами остеобластичного ряду, а й клітинами грануляційної тканини.

Загалом загоєння переломів можна розділити на дві категорії: первинне (пряме) і вторинне (непряме). Ці категорії передбачають узгодження каскаду низки біологічних процесів, які по-стадійно змінюються, накладаючись один на одного [69, 100, 101].

Для первинного зрощення кісток необхідні наступні умови: невелика відстань між кістковими уламками, яка має становити менше 1 мм, їх нерухомість і компресія ділянки перелому. При цьому в лінію перелому проникають клітини кісткової тканини – остеокласти та остеобласти. Перші формують лакуни та відновлюють гаверсову систему, а другі синтезують остеїд, з формуванням нових остеонів, які розміщуюються в дещо хаотичному напрямку. Далі відбувається їх перебудова в залежності від вектора навантаження [102]. Проте, такий тип загоєння у ветеринарній практиці зустрічається досить рідко.

У більшості випадків – це загоєння за вторинним типом, яке передбачає послідовну та виразну зміну стадій і проходить від краю материнської кістки до центральної частини міжвідламкового простору [102]. За непрямого загоєння (за вторинним типом) виділяють від 3-х до 5-ти стадій (фаз, етапів). Початковою є стадія гематоми, запалення, фіброваскуляризації (їх інколи поєднують в одну стадію запалення), а далі відбувається формування хрящово-кісткового регенерату і ремоделювання. Вторинне загоєння перелому характеризується спонтанністю за відсутності жорсткої фіксації ушкодженої ділянки [69].

Кісткова травма зумовлює комплексне порушення цілісності усього масиву тканин, включаючи поряд із ендостом, періостом, червоним кістковим мозком також шкіру, м'язи, сухожилки і судини, та супроводжується порушенням живлення пошкодженої ділянки, розвитком ендотоксикозу, ризиком її інфікування [35, 103]. Внаслідок кісткової травми відбувається крововилив, у результаті чого в місці перелому формується фібриново-кров'яний згусток (перша стадія), що виконує роль біологічної матриці, яка, з одного боку, з'єднує краї кісткових уламків, а з другого, забезпечує процеси адгезії, міграції та проліферації остеобластичних клітин [103–105]. За даними [64, 106] саме від нього залежить увесь подальший перебіг остеорепарації. Так, за трансплантації кров'яного згустка виникає енхондральний остеогенез [107].

Поряд з деструктивними явищами набувають розвитку остеоіндукційні процеси, в яких беруть участь клітини лейкоцитарного ряду (лімфоцити, нейтрофіли, еозинофіли, базофіли і макрофаги) і клітини, що розташовані біля краю материнської кістки. Вони починають продукувати простагландини та низку інших біологічно-активних речовин. За травматичного ушкодження судин із гранул тромбоцитів виділяються цитокіни і фактори росту, які індукують додаткову міграцію клітин лейкоцитарною ряду в місце травми не лише з судинного русла, а й, у першу чергу, з місцевих джерел. Крім фагоцитозу нежиттєздатних клітин і тканин, нейтрофіли та макрофаги також виробляють ряд біологічно-активних речовин, від яких залежать наслідки консолідації перелому. Серед них: інтерлейкін-1, що забезпечує регуляцію експресії циклооксигеназ; фактор некрозу пухлин-альфа, який бере участь у диференціації хондроцитів; інтерлейкін-6, що сприяє збільшенню кількості остеоцитів та мінералізації кістки, а також дозріванню та ремоделюванню кісткового мозоля. В свою чергу, фактор росту фібробластів та трансформуючий фактор росту- $\beta$  забезпечують проліферацію та диференціацію прогеніторних остеогенних стовбурових клітин. Завдяки міжклітинним взаємозв'язкам вони задіюють у процес остеогенезу



ендотеліальні клітини, хондроцити, остеобласти та остеокласти. Так, ендотеліоцити сприяють остеогенезу за рахунок продукування кісткових морфогенетичних білків. Новоутворена капілярна сітка забезпечує перетворення гіпертрофованих хондроцитів у кісткову тканину. Відомо [108, 109], що подовжена фаза запалення перешкоджає загоєнню кісткової тканини.

Наступна стадія фіброваскуляризації кісткового регенерата передбачає задіяння мезенхімальних стовбурових клітин-попередників, їх диференціювання у фібробласти, які забезпечують синтез колагенових волокон. Також паралельно відбувається формування нових капілярів, зокрема, в ділянках крайових відламків кістки, а в центральній частині кісткового мозоля наростають процеси васкулогенезу – формування нової судинної сітки з клітин ендотелію. Це забезпечує відновлення оксигенації, адже за час перелому порушення кровообігу викликає гострий клітинний некроз, ацидоз та місцеву гіпоксію тканин. У наступному етапі мезенхімальні стовбурові клітини диференціюються в хондробласти та остеобласти. Формування капілярної сітки виникає під впливом судинного ендотеліального фактора росту, який продукується клітинами кісткового мозоля перелому, включаючи хондроцити, остеобласти, клітини лейкоцитарної ряду тощо. За недостатньої васкуляризації виникає затримка зрощення кісткових уламків. Мезенхімальні стовбурові клітини походять з окістя, ендостоу, а також кісткового мозку. Регулювання їх диференціації відбувається на молекулярному рівні. В сформованому волокнистому мозолі починають утворюватися кісткові балки. Комплекс цих процесів перебігає у місці консолідації нерівномірно.

Зону репаративного остеогенезу розділяють [100, 110] на три частини. Перша – біля краю материнської кістки, де оксигенація тканин дещо вища. Тут раніше починаються процеси синтезу остеоїду і ремоделювання. У центральній ділянці в це час продовжується проростання судинної сітки у тканини м'якого кісткового мозоля. Між вищезазначеними ділянками

розташовується перехідна, у якій триває заміна тимчасово утвореної хрящової тканини на кісткову та мінералізація міжклітинної речовини.

Стадія формування хрящово-кісткового регенерату полягає у наступному [59]. Стовбурові клітини, які входять до складу кісткового мозоля, диференціюються у клітини фібро-, хондро- або остеогенного ряду. Досі до кінця не відомі чинники, від яких залежить шлях диференціювання. Припускають [110, 111], що це стабільність фіксації кісткових відламків, кисневе забезпечення тканин, безпосередній вплив факторів росту, зокрема, кісткових морфогенетичних білків. Мікрорухи провокують утворення великої кількості хрящової тканини, в той час як надійна фіксація викликає формування значної кількості клітин остеобластичного ряду, а також супроводжується прямим зрощенням кістки за присутності необхідних додаткових умов.

Індукція репаративного остеогенезу у вигляді каскаду молекулярно-біологічних процесів відбувається через низку біологічно-активних речовин та ангіогенних чинників [112]. Кожен з них впливає на певні етапи остеогенних процесів або ж забезпечує його стимуляцію на різних стадіях консолідації переломів. Зокрема, кісткові морфогенетичні білки (BMPs) є одними з найпотужніших остеоіндукторів диференціювання прогеніторних клітин саме у остеобласти та беруть участь у мінералізації і резорбуванні гіпертрофованого хряща [49, 113, 114]. Фактор росту тромбоцитів (PDGF) здатний посилювати синтез колагену I типу, але поряд з цим стимулює резорбцію кісткової тканини за рахунок збільшення кількості остеокластів [67]. Трансформуючий фактор росту-бета (TGF- $\beta$ ) індукує диференціацію остеогенних клітин та продукцію ними основної речовини кісткової тканини [115]. Фактор росту фібробластів (FGF) регулює остеогенез, хондрогенез та гомеостаз кісткової тканини [116]. Інсуліноподібні фактори росту-1 (IGF-1) та 2 (IGF-2) стимулює синтез колагену, забезпечує активацію та проліферацію остеобластів і бере участь в утворенні хрящової тканини [117]. Судинно-ендотеліальний фактор росту (VEGF) забезпечує процес васкуляризації

кісткового мозоля протягом усього періоду зрощення і ремоделювання кісткової тканини [69]. Епідермальний фактор росту (EGF) та Інтерлейкін-8 (IL-8) зумовлюють міграцію мезенхімальних стовбурових клітин [67], фактор росту кератиноцитів (KGF) та фактор росту сполучної тканини (CTGF) забезпечують молекулярні механізми диференціювання остеопрогеніторних клітин [118–120]. Саме завдяки зазначеним біологічно активним речовинам реалізується, характерний для кісткової тканини, клітинний тип регенерації [121].

Ключову роль у репаративному остеогенезі відіграють процеси васкуляризації кісткового мозоля. Це істотно відрізняє остеогенез від хондрогенезу, який відбувається в умовах гіпоксії [69, 112]. Затримка репаративного остеогенезу на стадії хрящового мозоля призводить до низки його ускладнень. Неоваскулогенез, окрім VEGF, індукується оксидом азоту (NO). Важливо, що ступінь оксигенації значною мірою впливає на продукцію колагену I типу в кістковій тканині та підтримує процеси неоангіогенезу.

NO – це вільний радикал, індуктор ангіогенезу, який продукується у макрофагах, нейтрофілах, клітинах кісткового мозку, еозинофілах, моноцитах індукцибельною формою NO-синтази (NOS) [122]. При цьому виникає експресія інтерлейкінів та інтегринів ендотеліальними клітинами, що викликає міграцію і диференціацію клітин та сприяє формуванню сітки судинних каналців у зоні репарації [123, 124]. Низка досліджень [43, 123, 124] свідчить про позитивний вплив донаторів NO на ангіогенез та мікроциркуляцію в зоні перелому за рахунок помірного підвищення рівня оксиду азоту в крові і посилення синтезу тканинного активатора плазміногену.

Окрім місцевих індукторів репаративного остеогенезу виділяють [36] ряд системних чинників, таких як соматотропний і кортикотропні гормони, паратгормон, естрогени. Соматотропний гормон у молодих тварин має ключове значення на регуляцію росту кісток скелету, забезпечує контроль, диференціацію і проліферацію хондроцитів, остеобластів та стимулює синтез останніми колагену I типу. Антагоністом соматотропного виступає

адренкортикотропний гормон. Він урівноважує процеси росту кісткової тканини та її формування [125–127]. Паратгормон регулює обмін кальцію та фосфору, що вивільняються у результаті резорбції кісткової тканини активованими остеокластами, а кальцитонін виступає його антагоністом [128]. Естрогени, у свою чергу, уповільнюють кісткову резорбцію, що запобігає розвитку остеопорозу, а також індукують фазу проліферації та енхондральної осифікації за репаративного остеогенезу [129, 130].

Тривалість та інтенсивність перебігу кожної із стадій репаративного остеогенезу носить індивідуальний характер і залежить від багатьох факторів та накладається одна на іншу. Однак у разі виникнення складних осколкових переломів, під час проведення репозиції кісткових уламків та їх остеосинтезу відбувається руйнування гематоми та її видалення разом із кістковими осколками, що призводить до зниження остеорегенеративного потенціалу [64, 69, 70], яке супроводжується уповільненням консолідації в часі та можливим розвитком ускладнень.

Для оптимізації загоєння переломів із значними дефектами кісткової тканини нині пропонують низку остеозаміщувальних матеріалів із остеокондуктивними та остеоіндуктивними властивостями, зокрема і у тварин-компаньйонів [131]. Хоча кісткові аутотрансплантати все ще вважаються найбільш оптимальним матеріалом для відновлення дефектів кісткової тканини, проте їх застосування, особливо у ветеринарній ортопедії, надзвичайно обмежене за низки причин [67]. Головним чином, у зв'язку з їх недостатнім об'ємом та нанесенням додаткової травми пацієнтові [55].

До матеріалів, які пропонуються для остеозаміщення, відносять біоактивну кераміку, біоактивне скло, біологічні та синтетичні полімери. Заразом найбільш перспективною в цьому разі вважається кальцій-фосфатна кераміка – гідроксиапатити, трикальційфосфати та їх комбінації, які володіють [47, 55] біосумісністю, достатньою остеокондуктивністю та поступовою біодеградацією, що має свої приклади для застосування у ветеринарній ортопедії, у тому числі легованої кремнієм, германієм, магнієм, які здатні

індукувати остеогенез [10, 53, 70, 132, 133]. Різні матеріали для остеозаміщення, у своїй більшості, володіють переважно остеокондуктивними властивостями, що зумовлює їх комбінацію з компонентами регенеративної медицини, здатними до індукції та регуляції молекулярно-біологічних механізмів репаративного остеогенезу [45, 46]. Водночас гістоморфологічні та молекулярно-біологічні механізми репаративного остеогенезу в умовах остеозаміщення залишаються недостатньо вивченими, особливо їх ключові критерії у визначенні ефективності остеозаміщувальних матеріалів та їх впливу на репаративні властивості кісткової тканини.

## **1.2. Принципи і засоби регенеративної медицини**

Регенеративна медицина – галузь, яка спрямована на заміну або відновлення клітин, тканин або органів та їх функції, втрачених через хворобу, травмування, вікові зміни або генетичного походження. Вона включає в себе тканину інженерію та використання клітинних технологій, тобто застосування мезенхімальних стовбурових клітин, тромбоцитарних концентратів, аутологічних кондиціонованих та білкових розчинів, факторів росту. Її принципи зводяться до наступного: заміщення ушкодженої, нефункціонуючої тканини чи певної клітинної популяції; стимулювання власних прогеніторних клітин організму і посилення репаративної регенерації; доставки лікувальних засобів, генетичних конструкцій або біомолекул [118, 134, 135].

Фундаментальним принципом регенерації тканин опорно-рухового апарату і його тканинної інженерії є наявність:

- 1) носія і механічного фактора, які забезпечують остеокондуктивність;
- 2) клітинного компонента (мезенхімальні стовбурові клітини, хондроцити, остеобласти, тромбоцити);
- 3) морфогенетичного компонента (кісткові морфогенетичні білки та різноманітних факторів росту.

Всі зазначені компоненти можуть застосовуватися у вигляді

остеозаміщувальних конструкцій, тканинно-інженерних компонентів чи у ін'єкційних формах.

Водночас використання різних способів одержання, шляхів введення, кількості клітин і біологічно активних факторів може викликати розбіжності у результатах одержаних *in vitro*, *in vivo* та клінічній ефективності. Незважаючи на певні досягнення клініко-експериментальних досліджень щодо обґрунтованого і раціонального використання потенціалу регенеративної медицини все ще потребують вивчення, з урахуванням складності одержання матеріалу, доцільності нанесення додаткової травми пацієнту, біоетичних критеріїв, часу і умов їх підготовки до застосування та вартості [136].

Серед клітинних компонентів перспективними вважаються стовбурові клітини-попередники [137] і здатні до самовідновлення та диференціювання у різні типи хрящової, кісткової та м'язової тканин. Відомо [138–140], що загалом існують наступні джерела одержання плюрипотентних стовбурових клітин (здатних диференціюватися в лінії мезенхімальних тканин, таких як хрящі, кістки, жири, м'язи, сухожилля та інші клітини мезенхімальної лінії за відповідних умов) – ембріональні тканини, тканини плоду, постнатальні тканини. Джерелом індукованих плюрипотентних (штучно створених за рахунок введення у зрілу диференційовану клітину факторів транскрипції, внаслідок чого виникає запуск програми перетворення клітини на недиференційовану стовбурову) – диференційовані соматичні клітини [141]. Ембріональні стовбурові клітини, одержують із амніону, пуповинної крові та власне тканин пуповини. Перешкоди до їх клінічного використання полягають в етичних та юридичних аспектах, пов'язаних з використанням ембріонів.

Одержання стовбурових клітин з тканин дорослого організму (соматичних) проводиться з кісткового мозку, жирової тканини, синовіальної оболонки, пульпи зубів, сухожилків, м'язів, періосту тощо [134]. Проте після відбору матеріалу їх необхідно ізолювати та виконати низку наступних маніпуляцій: очищення, фракціонування, культивування, модифікування тощо, а також забезпечити введення клітин в організм. Це етапи доволі тривалі

у часі та передбачають використання високовартісних середовищ для культивування клітин, а по завершенні і, відповідно, вихідного матеріалу стовбурових клітин.

Більш доступними для цілей регенеративної медицини є тромбоцити периферичної крові у формі технологічно різноманітних тромбоцитарних мас чи концентратів.

Поняття «тромбоцитарні маси» – це термін, що узагальнює назву продуктів, виготовлених шляхом центрифугування периферичної крові відразу після відбору її зразка. Вони можуть бути активовані, неактивовані, з лейкоцитами або без, але всі характеризуються підвищеною до певного рівня концентрацією тромбоцитів [78]. Тромбоцитарні маси набули суттєвого використання в клінічній практиці в основному завдяки простоті та швидкості їх одержання, використання приладів, які часто є в кожній клініці, та відсутності потреби додаткових тривалих обробок, а головне, високої концентрації біологічно активних молекул у їх складі – факторів росту та цитокінів, що відіграють важливу роль у регенерації тканин. При цьому [120, 142, 143] тромбоцитарні концентрати отримують за допомогою малоінвазивних процедур, але вони мають потужний лікувальний ефект, а використання аутологічних матеріалів (виготовлених з власної крові пацієнта) зводить до мінімуму ризику передачі інфекційних захворювань від донора до реципієнта [144].

Початок використання PRP-матеріалів припав на 1970-ті роки і до 1980 інтерес до цих речовин суттєво зріс. Тромбоцитарні маси попередньо використовували лише для лікування тяжких тромбопеній чи значних втрат крові. І тільки згодом стали використовувати їх для ізоляції (закриття) ран у вигляді клеїв фібрину, тобто надавали гелеподібної форми за рахунок додавання хлориду кальцію та тромбіну, що зумовлювало полімеризацію фібрину [78, 145, 146]. В умовах сьогодення PRP – це біологічна речовина з нативної крові, яку отримують шляхом процедури центрифугування та

відділення від еритроцитарної маси, результатом є плазма, збагачена тромбоцитами.

Коло нозологічних форм, за яких пропонується використання тромбоцитарних мас у гуманній медицині досить широке. Аутологічні тромбоцитарні маси стимулюють синтез колагену, індукцію росту судин, зменшують біль, забезпечують гемостаз, прискорюють регенерацію, знижують ризик післяопераційних інфекційно-запальних ускладнень, що зумовило їх використання у лікуванні ран м'яких тканин та індукції репаративного остеогенезу за кісткових дефектів, різних форм суглобової патології [147–151].

В цілому відбуваються накопичення клінічного матеріалу щодо застосування тромбоцитарних концентратів у різних напрямках гуманної медицини, таких як ортопедія, оториноларингологія, гінекологія, косметична і естетична хірургія, офтальмологія, загальна хірургія і стоматологія [57, 78], а також останнім часом і у ветеринарній медицині [152–154]. Плазма, збагачена тромбоцитами, володіє потужними остеоіндуктивними властивостями, у зв'язку з чим її поєднують із різними остеокондуктивними матеріалами [155], використовуючи у травматології.

Різні форми тромбоцитарних мас виготовляються шляхом модифікації протоколів центрифугування крові (рис. 1.1). В основу їх класифікації закладено два основні параметри, такі як архітектура фібрину та вміст клітин. В залежності від цього, тромбоцитарні концентрати розділяють на 5 основних категорій [77, 78].

Чиста плазма, збагачена тромбоцитами (Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP)) або плазма збагачена факторами росту (Plasma Rich in Growth Factors (PRGF)). Її одержують за рахунок фільтрації крові і тромбоцитозезу чи плазмофезу, що значно підвищує собівартість вихідного матеріалу, або ж шляхом двоступеневого центрифугування. Вона містить високу концентрацію тромбоцитів і в ній практично повністю відсутні клітини лейкоцитарного ряду [77, 78].



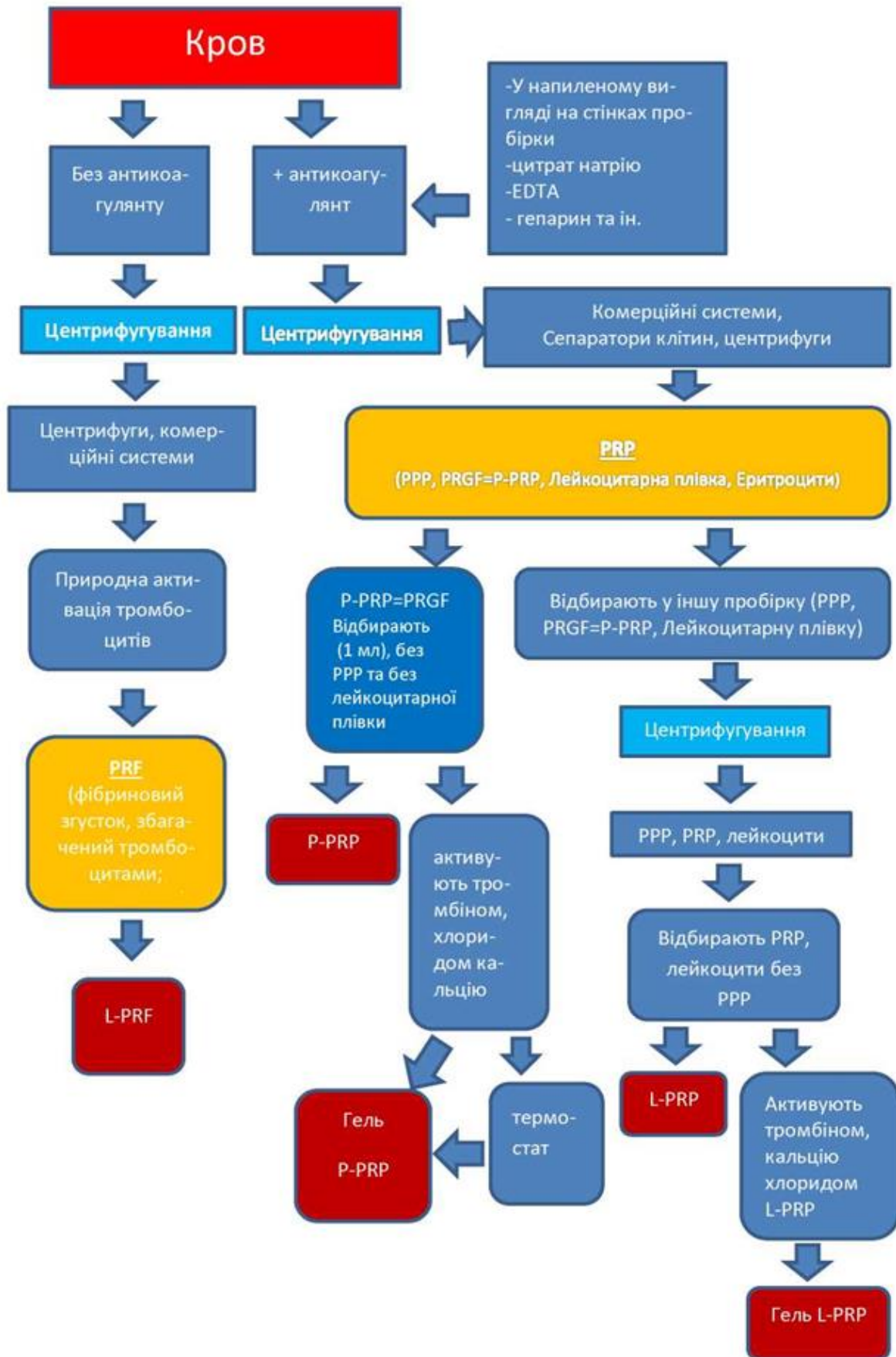


Рис. 1.1. Приготування тромбоцитарних мас

Плазма, збагачена лейкоцитами та тромбоцитами (Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma (L-PRP)), яка має дещо більший вміст тромбоцитів і лейкоцитів, порівняно з P-PRP, а також містить фібринову сітку низької щільності після активації цього матеріалу. Виготовляється двоступеневим центрифугуванням.

Ці категорії використовують у рідкій (ін'єкційній) та гелеподібній формах (для місцевого застосування). При цьому активація тромбоцитів молекулами кальцію хлориду, тромбіну тощо, протягом часу, який становить від 10 хв до 1 год, зумовлює випуск тромбоцитами 60–70% факторів росту, після 2–3-ї доби поступово знижується і затухає до 7–8-го дня. Відомо [156], що це залежить від структури фібрину.

Чистий фібрин, збагачений тромбоцитами (Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF, P-PRFM)), комерційна назва Fibrinet (технологія його виготовлення передбачає використання антикоагулянту хлориду кальцію) [157, 158]. Він отримується шляхом повільного центрифугування спочатку при 1000 g, а згодом – вищої відцентрової сили, яка становить 3500 g. Кінцевим продуктом є гель, що має дещо жорсткішу фібринову сітку, порівняно з PRP. Випуск факторів росту відбувається впродовж 7 діб. Цей біоматеріал не використовується в рідкій формі [73, 77, 156, 159].

Фібрин, збагачений лейкоцитами та тромбоцитами (Platelet-Rich Fibrin (L-PRF)) [88, 160, 161] – це матеріал для місцевого використання, представлений активованою фібриновою сіткою досить високої щільності з великим умістом лейкоцитів і тромбоцитів. Його одержують одноступеневим центрифугуванням.

Ін'єкційний фібрин, збагачений тромбоцитами (injectable-Platelet-Rich Fibrin (i-PRF)) – різновид L-PRF, з більшим умістом клітин лейкоцитарного ряду, порівняно з попереднім. Можливе його застосування у рідкій формі, що поступово переходить у щільну [88, 162–164].

Лікувальна ефективність P-PRP та PRF ґрунтується на дії значної кількості факторів росту та інших сигнальних молекул, зосереджених у

гранулах тромбоцитів [118]: фактор росту тромбоцитів (PDGF) [143, 165]; трансформуючий фактор росту-бета (TGF- $\beta$ ) [166]; фактор росту фібробластів (FGF) [120]; інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1) [78]; інсуліноподібний фактор росту-2 (IGF-2); судинний фактор ендотеліального росту (VEGF) [57]; епідермальний фактор росту (EGF); інтерлейкін 8 (IL-8), фактор росту кератиноцитів (KGF) та фактор росту сполучної тканини (CTGF) [118, 119].

Їх молекули індукують та регулюють ангіогенез, позаклітинне матричне ремоделювання і клітинні ефекти: задіяння стовбурових клітин, їх адгезію, хемотаксис, проліферацію і диференціювання [167]. Тобто вони здатні впливати на будь-яку стадію регенеративного процесу – запальну, проліферативну та ремоделювання. Проте ефективність їх впливу на ці біологічні процеси значною мірою залежить від ступеню вивільнення і активності факторів росту та інших субстанцій тромбоцитів, щільності фібринової мережі, зумовлені технологією і протоколом їх концентрування, що потребує глибокого та всебічного дослідження.

### **1.3. PRP-технології: біологічні, технологічні та клінічні аспекти застосування у ветеринарній медицині**

**1.3.1. Біологічні властивості тромбоцитів і фібрину.** PRP-технології включають застосування клітин – тромбоцитів, що містяться у певному об'ємі плазми крові. Це без'ядерні сферичні клітини діаметром 2–4 мкм [168]. У кровоносному руслі вони циркулюють близько 9-11 діб, здатні до миттєвої адгезії, агрегації та секреції вмісту своїх гранул [169], першими накопичуються у великій кількості у ділянках пошкоджених стінок судини і оточуючих тканин [170]. Тромбоцити містять практично всі можливі джерела активних форм кисню, такі як ксантинооксидаза, цитоплазматична НАД(Ф)Н-оксидаза, мітохондрії і ферменти, що каталізують перетворення арахідонової кислоти. Активні форми кисню виконують безліч функцій в організмі: участь у реакціях окисного фосфорилування, біосинтезу простагландинів і

нуклеїнових кислот, у процесах мітозу та розпаду фагоцитованих клітин бактерій [171].

У тромбоцитах є близько 5 щільних тіл і 35  $\alpha$ -гранул, які виконують функцію основних резервуарів різноманітних біологічно активних речовин [170]. Перші з них представлені органелами, зв'язаними із лізосомами, та містять кальцій, магній, серотонін, гістамін, а також пурини – АДФ и АТФ [172], тоді як  $\alpha$ -гранули містять фактори росту у неактивній формі.

Активація тромбоцитів відбувається низкою стимуляторів (тромбін, хлорид кальцію, колаген тощо) [173] за рахунок контакту із специфічними рецепторами, розташованими на їх поверхні, або ж унаслідок взаємодії з колагеном, фактором Віллебранда та іншими адгезивними білками. При цьому підвищується внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію, внаслідок чого білки клітинної мембрани тромбоцитів опосередковують адгезію і агрегацію [168, 174, 175].

Загалом, завдяки складній і багаторівневій організації, тромбоцити здійснюють і контролюють адгезію, агрегацію і первинний судинно-тромбоцитарний гемостаз, ангіотрофічну та репаративну функції, що стало підставою до використання їх концентратів чи комбінації із фібрином і лейкоцитами за різноманітної патології.

Відомо [67, 85, 176–179], що тромбоцитам належить суттєва роль у репаративному остеогенезі завдяки дії їх паракринних біомолекул – факторів росту та цитокінів [180], які виконують певну роль у процесах відновлення пошкоджених структур: запаленні, синтезі колагену та ініціації ангіогенезу [62, 181].

Фактори росту, що зосереджені в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитів, здатні індукувати регенерацію тканин за рахунок інфільтрації, росту, диференціювання, міграції та апоптозу клітин [71, 183].

Серед них вирішальна роль у регенерації кісткової тканини належить PDGF і TGF- $\beta$  [184]. PDGF (platelet-derived growth factor) — тромбоцитарний фактор росту, який секретується, головним чином, тромбоцитами, але також і

моноцитами, макрофагами та ендотеліоцитами. Для його транспортування необхідний  $\alpha_2$ -макроглобулін. Мітогенний ефект цього фактору поширюється на пул клітин кісткової тканини та на фібробласти пухкої сполучної тканини. Також він здатний посилювати синтез колагену 1-го типу – основного органічного компоненту кісткової тканини, стимулює її резорбцію за рахунок збільшення кількості остеокластів [143, 165, 185].

TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) – трансформуючий фактор росту, секретується остеобластами та остеокластами, займає одне з ключових місць у метаболізмі кісткової тканини, індукуючи проліферацію остеогенних клітин та основної речовини кісткової тканини [166, 185].

Також у гранулах тромбоцитів містяться такі речовини, як VEGF (vascular endothelial growth factor) – судинний ендотеліальний фактор росту, який надзвичайно важливий для ендохондральної осифікації, оскільки забезпечує процес васкуляризації кісткового мозоля. Він зберігає активність протягом усього періоду зрощення і ремоделювання кісткової тканини [57, 120].

Поряд з цим IGF I і II (insulin-like growth factor) – інсуліноподібні фактори росту, що стимулюють синтез колагену, забезпечують активацію і проліферацію остеобластів та беруть участь в утворенні хрящової тканини [78, 107].

Водночас, фактор росту фібробластів (fibroblast growth factor – FGF) одним із перших розпочинає діяти за консолідації переломів, беручи участь у хондрогенезі [120], тобто у формуванні первинного кісткового мозоля.

Фібрин – це волокнистий білок, що грає ключову участь у згортанні крові, і є основним компонентом тимчасової позаклітинної матриці, утвореної після травми тканин. Формування сітки фібрину генерується шляхом полімеризації розчинного фібрину, що утворюється із фібриногену під дією тромбіну, активованого під час пошкодження тканин. Тимчасова фібринова матриця з часом замінюється колагеном, фібронектином та іншими компонентами, що теж виступають у ролі позаклітинної матриці для

формування нової тканини. Проте фібрин не тільки виступає у якості каркасу, в який інфільтруються клітини (тромбоцити, лейкоцити чи фібробласти), а й забезпечує молекулярні сигнали тобто модуляцію клітин імунної системи у процесі відновлення пошкоджених тканин. Так, макрофаги беруть участь у початковій фазі запалення. Вважається, що фібриноген посилює активацію макрофагів, тим самим посилює запальну реакцію, в основному шляхом зв'язування з відповідними рецепторами. Також фібриноген може сприяти альтернативній активації макрофагів. В контексті біоматеріалів адсорбція фібриногену до поверхонь біоматеріалів вважається важливим для задіяння макрофагів [186]. Однак включення фібриногену до складу фібрину може вплинути на його властивості до зв'язування та на механічну форму, а також на конформацію білка. Останні можуть вплинути на молекулярну структуру [106, 186–188], на взаємодію фібрину або ж фібриногену з макрофагами та передачу сигналів. Тому важливо враховувати потенційну відмінність впливу фібрину та фібриногену на функцію макрофагів та їх задіяння у фазі запалення [106].

Відомо [64], що мережа фібринових ниток у сукупності з клітинами крові представляє собою гематому і забезпечує не лише зупинку кровотечі, а й сприяє остеорепації. Інфільтрація гематоми ендотеліальними клітинами та фібробластами з утворенням нових капілярів та синтезом матричного колагену зрештою приводить до утворення, так званої, кісткової грануляційної тканини, яка заміщує кров'яний згусток міжвідламкового простору [67]. Порушення послідовності чи переривання цього процесу зумовлює зниження остеорепаративного потенціалу [45, 68].

### **1.3.2. Методики отримання плазми, збагаченої тромбоцитами.**

Різноманітність форм та способів застосування тромбоцитарних концентратів дає змогу їх використання для регенерації різних типів тканин. Однак достовірність клінічних результатів істотною мірою залежить від методики отримання тромбоцитарного концентрата, від якої залежить як кількість у

ньому тромбоцитів, так і спрямованість та ступінь їх функціональної активності. При цьому суттєву роль відіграє тип центрифуги, швидкість її обертання [88, 89, 160] і діаметри роторів, оскільки за різних їх параметрів отримують різні за складом і властивостями тромбоцитарні матеріали, що на сьогодні є найбільш дискусійним щодо об'єктивності результатів клінічних досліджень [182]. Розрахунок відносної відцентрової сили (g) дозволяє визначити бажану швидкість центрифугування для кожної центрифуги [74].

PRP містить концентрацію тромбоцитів набагато вищу, ніж зразок периферичної крові, яка у три-шість разів перевищує початковий рівень та коливається в межах від 300 000 до понад 1 500 000 клітин/мм<sup>3</sup>, що залежить від сили та часу центрифугування, загального об'єму крові, властивостей цього процесу медіаторів для їх активації [189]. Незважаючи на те, що безліч таких PRP-біоматеріалів суттєво відрізняються між собою, зокрема, за кількістю тромбоцитів та складом клітин, а отже, і впливу на їх потенційну ефективність після клінічного застосування. При узагальненні одержаних результатів та вивченні впливу на різні нозологічні форми патологій після використання різних методів одержання PRP, тобто відмінних за своїми властивостями матеріалів виникають суперечливі погляди на їх ефективність.

PRP одержують за одноступеневого чи двохступеневого центрифугування. Спочатку зразки венозної крові переносять у пластикову пробірку з антикоагулянтом [120, 143]. Далі кров центрифугують за певної швидкості визначений час (табл. 1.1). Режими центрифугування крові залежать від діаметра ротора центрифуги, а також від кута його нахилу [182]. Наявні спеціальні центрифуги для плазмоліфтинга – технології одержання PRP, та пробірки з розділювальним гелем – комерційні системи. Після центрифугування відбувається відділення шару еритроцитів (55 %), над яким утворюється лейкоцитарна плівка (5 %), а над нею шар плазми (40 %) [88]. У свою чергу плазма теж розподіляється на декілька шарів – шар плазми, збагаченої тромбоцитами, розміщений відразу над лейкоцитарною плівкою,

Таблиця 1.1

**Методики приготування плазми, збагаченої тромбоцитами**

№	Назва	Антикоагулянт	К-ть ступенів центрифугування	Протокол центрифугування, (лейкоцитарна плівка)	Активация	Рік	Джерело
1	PRP	Цитрат натрію	2	5600 об/хв – 10 хв (з лейкоцитарною плівкою) 2400 об/хв – 15 хв	Тромбін + кальцію хлорид	2008	[192]
2	PRP	Цитрат натрію	1	460 g – 8 хв (без лейкоцитарної плівки)	Кальцію хлорид	2009	[77]
3	PRP	SiO	1	2800 об/хв – 9 хв	Не вказано активатор	2011	[194]
4	PRP	Цитрат натрію	2	1600 об/хв – 10 хв (з лейкоцитарною плівкою) 2000 об/хв – 10 хв	Кальцію глюконат	2016	[89]
5	PRP	Цитрат натрію	1	400 g – 10-12 хв (не вказано)	Не вказано активатор	2017	[190]
6	PRP	Кислота-цитрат-декстроза	2	3000 об/хв – 3 хв (не вказано забір лейкоцитарної плівки) 4000 об/хв – 3 хв	Тромбін та Кальцію хлорид	2018	[88]
7	PRP	Цитрат натрію	2	2400 об/хв – 10 хв 5000 об/хв – 10 хв	Кальцію хлорид	2018	[191]
8	PRP	Цитрат натрію	2	2800 об/хв – 15 хв (з лейкоцитарною плівкою) 2800 об/хв – 15 хв	Кальцію хлорид	2018	[160]



9	PRP	Цитратна декстроза фосфата	2	400 g – 15 хв (з лейкоцитарною плівкою) 160 g – 20 хв	Не вказано активатор	2018	[155]
10	PRGF	Цитрат натрію	1	460 g – 8 хв (без лейкоцитарної плівки)	Кальцію хлорид	2018	[195]
11	PRP	Кислота-цитрат-декстроза	2	1800 об/хв – 8 хв (не вказано забір лейкоцитарної плівки) 1000 об/хв – 8 хв	Кальцію хлорид	2018	[151]
12	PRP	Цитрат натрію, гепарин	2	200 g – 30 хв (не вказано забір лейкоцитарної плівки) 450 g – 10 хв	Кальцію хлорид	2019	[74]

його об'єм складає близько 1/3 об'єму усієї плазми та шар плазми, збідненої тромбоцитами – 2/3 об'єму. Після цього за допомогою шприца чи піпетки плазму, збагачену тромбоцитами відбирають та переливають в іншу пробірку [155, 190]. Її використовують або неактивовану (рідку), або ж активують за допомогою різноманітних речовин, таких як глюконат кальцію, хлорид кальцію, тромбін великої рогатої худоби чи іншими речовинами [89, 191, 192]. Вони спричиняють вихід різного ступеня з гранул тромбоцитів різноманітних факторів росту і перетворення рідкої плазми у гелеподібну форму. Водночас залишається відкритим питання кількісної та якісної елімінації із тромбоцитів факторів росту залежно від методики одержання PRP. А також використання різноманітних пробірок для PRP-терапії від різних виробників (звичайних з антикоагулянтом, з розділювальним гелем чи пробірок специфічної форми) та їх вплив на кількість тромбоцитів [193].

За двоступеневого центрифугування на першому етапі еритроцити відділяються від плазми і лейкоцитів з тромбоцитами. Під час другого етапу відбувається остаточне розділення плазми, лейкоцитів і тромбоцитів. Як і у попередньому випадку, кров відбирають з антикоагулянтном і центрифугують. Відбувається відділення шару еритроцитів, над яким утворюється лейкоцитарна плівка, а над нею шар плазми. Всю плазму з лейкоцитарною плівкою або без (в залежності від того, який тип плазми необхідно виготовити: чисту плазму, збагачену тромбоцитами, чи плазму, збагачену лейкоцитами та тромбоцитами) за допомогою піпетки відбирають у іншу пробірку, яку піддають наступному центрифугуванню (табл. 1.1). В результаті біля основи пробірки утворюється шар плазми, збагаченої тромбоцитами [74]. Після закінчення центрифугування, відокремлену від збідненої тромбоцитами плазми, тромбоцитарну масу набирають у шприц і активують за допомогою різних активаторів (хлорид кальцію, кальцію глюконат, тромбін). Кінцевим продуктом є гель [119]. Активація PRP підвищує рівень стимулювання регенерації тканин. Існує чотири основних підходи до активації тромбоцитів, які передбачають використання аутологічного тромбіну,  $\text{CaCl}_2$ , 10% колагену типу I, суміш  $\text{CaCl}_2$  та тромбіну. Ще одним методом активації тромбоцитів є використання різниці температур (заморожування – розморожування). Стандартизування активації тромбоцитів є вирішальним кроком у оптимізації елімінації різних факторів росту та цитокінів для їх застосування. Аналізи методів активації включають експерименти на тваринах та клінічні випробування [89]. У більшості випадків застосовують хлорид кальцію та його поєднання з тромбіном. Проте різні активатори тромбоцитів можуть суттєво впливати на кінетику вивільнення цитокінів у PRP. Зокрема, колаген має більш тривалий характер вивільнення факторів росту, тоді як тромбін може генерувати миттєвий їх випуск [196]. Встановлено [197], що TGF- $\beta$ , FGF і PDGF різко вивільнялися протягом 2 діб у PRP, після чого вивільнення факторів росту значно сповільнювалося. Отже, активація PRP – це чинник, який варто враховувати перед застосуванням [198].

Отже, суттєва відмінність у методиках одержання PRP здатна вплинути на властивості кінцевого матеріалу і бере свій початок ще на етапі відбору крові, адже використовуються різні антикоагулянти. Далі має значення час, сила і кількість етапів центрифугування, що впливає на кількість клітин та їх склад. На завершення, застосування різних активуючих речовин зумовлює до одержання нерідко різних за характером впливу на регенерацію PRP-матеріалів.

### **1.3.3. Методики отримання фібрину, збагаченого тромбоцитами.**

PRF – це друге покоління речовин, концентруючих тромбоцити, що також може містити у своєму складі клітини лейкоцитарного ряду. Вони одержуються без додавання екзогенних субстанцій [199]. Він вперше розроблений у Франції Choukroun у 2001 році [182, 200] та використовувався для прискорення загоєння ран.

Технологія приготування цього матеріалу передбачає відбір крові у пластикову пробірку без антикоагулянту та негайне центрифугування (табл. 1.2). Після цього в нижній частині пробірки зосереджуються еритроцити, в середній – згусток фібрину, збагачений тромбоцитами, у верхній – сироватка. Також повідомляється [200], що, крім центрифуг, матеріал, з якого виготовлені пробірки для відбору крові (скло або пластик, титан тощо) впливає на активацію тромбоцитарних мас та полімеризацію фібрину, а отже і міцність та щільність фібринової матриці.

Необхідно враховувати, що як і у плазмі, збагаченій тромбоцитами, у згустку фібрину найвища концентрація клітинних елементів розташована у його нижній третині. У верхній третині тромбоцити можуть зустрічатися в дуже малій кількості або бути відсутніми [71, 201, 202]. Найважливіший параметр для успішного проведення цієї процедури – якомога мінімальний проміжок часу між процесом відбору та центрифугування крові [147, 161].

I-PRF (injectable-Platelet-Rich-Fibrin) – ще одна з форм тромбоцитарних мас [203], яка розроблена у 2014 році шляхом модифікації сил

Таблиця 1.2

**Методики приготування фібрину, збагаченого тромбоцитами**

№	Назва	Протокол центрифугування			Рік	Джерело
		Швидкість обертання об/хв	Відносна відцентрова сила, g	Час, хв		
1	PRF	3000	400 g	10 хв	2006	[71]
2	L-PRF Чукруна	2700-3000	400 g	10-12 хв	2018	[161]
3	L-PRF	2700	Не вказано	12 хв	2018	[88]
4	PRF	3000	Не вказано	10 хв	2018	[160]
5	PRF	Не вказано	1843 g	10 хв	2018	[205]
6	PRF	Не вказано	400 g	10 хв	2018	[115]
7	PRF	1500	Не вказано	14 хв	2018	[149]
8	PRF	2700	735g	12 хв	2019	[206]
9	PRF	2700	400 g	12 хв	2019	[163]

центрифугування, проте вона концентрує у своєму складі значно вищу кількість клітин лейкоцитарного ряду. В основі приготування і-PRF лежить центрифугування на низькій швидкості та використання пластикових пробірок для попередження передчасного згортання крові. В результаті кров розподіляється на такі фракції: в нижній – еритроцити, в середній – червонувата рідина – рідкий фібрин, збагачений тромбоцитами, в якому в більшій мірі концентруються лейкоцити та тромбоцити, у верхній – жовта, з меншою кількістю клітинних елементів [163] (табл. 1.3). Через декілька хвилин відбувається полімеризація фібрину і він перетворюється у щільний згусток. Складність приготування ін'єкційного фібрину виправдана ширшими можливостями його застосування на відміну від згустку PRF: у вигляді ін'єкції та у поєднанні з іншими матеріалами, формуючи однорідний композит [88,

162, 164]. Проте властивості PRF та його різних форм потребують детальнішого вивчення, як і плазми, збагаченої тромбоцитами [163].

Таблиця 1.3

**Методики приготування ін'єкційного фібрину, збагаченого  
тромбоцитами**

№	Назва	Протокол центрифугування			Рік	Джерело
		Швидкість обертання об./хв.	Відносна відцентрова сила, g	Час, хв		
1	i-PRF	700	60 g	3 хв	2017	[162]
2	i-PRF	2400-2700	Не вказано	2-3 хв	2018	[88]
3	i-PRF	700	60 g	3 хв	2019	[163]
4	i-PRF	3300	Не вказано	2 хв	2015	[164]

За даними [204] Choukroun, розробник PRF, провів додаткову модифікацію протоколу його одержання, який полягає у низькошвидкісному центрифугуванні і формуванні «розширеної» форми (A-PRF – advanced platelet-rich fibrin), яка повинна містити відносно більшу кількість лейкоцитів. Повідомляється [79], що вона вивільняла значно більшу загальну кількість факторів росту, порівняно з традиційною PRF.

Ще однією модифікованою формою PRF [200] є фібрин, збагачений тромбоцитами, одержаний у титанових пробірках (T-PRF – Titanium-prepared, platelet-rich fibrin). Він представляє собою концентрат тромбоцитів, метод приготування якого ґрунтується на гіпотезі про те, що титанові пробірки можуть бути більш ефективнішими для активації тромбоцитів, ніж скляні. При цьому параметри центрифугування не відрізняються від загальновідомих.

Однак, у ветеринарії відсутність стандартизації протоколів щодо одержання цих речовин та контролю клітинного вмісту, різноманіття активаторів, що використовуються в комплексі для ініціації втрати зернистості

тромбоцитів та полімеризації фібриногену. Так, розрізнені характеристики, які не завжди детально описані публікаціях стосовно методик приготування, створюють перешкоди та ускладнюють об'єктивну оцінку клінічних результатів використання цієї категорії речовин [57, 207, 208].

**1.3.4. Використання PRP-технологій у ветеринарній медицині.** У літературі представлена достатньо велика кількість досліджень на тваринах та зазначається ефективність і безпечність застосування PRP та PRF для відновлення чи покращення регенерації різноманітних тканин. У першу чергу це пов'язують з високою концентрацією факторів росту в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитів, про що свідчить низка досліджень форм тромбоцитарних мас *in vitro* [142, 179, 203, 209]. Однак застосування PRP чи PRF у тварин переважно проводилося в рамках протоколів експериментальних чи доклінічних дослідження, тоді як власне клінічне застосування у продуктивних і тварин-компаньйонів представлено лише у поодиноких публікаціях [87, 154, 210, 211].

Для доклінічного вивчення регенеративних властивостей різних типів тканин найчастіше використовуються такі види тварин: кролики, щури, собаки, вівці, кози та свині. Проте, кожен з них має свої генотипові особливості та різні фізіологічні критерії щодо об'ємів циркулюючої крові, вмісту кількості тромбоцитів та інших клітин у крові, видові особливості перебігу запального процесу. Це ускладнює міжвидове порівняння ефективності плазми та фібрину, збагачених тромбоцитами, навіть за типових нозологічних форм патології. При цьому одержання тромбоцитарних концентратів зазвичай проводилися за різних параметрів часу і швидкості центрифугування, об'ємів зразків крові, що, в кінцевому результаті, є наслідком формування відмінних за складом продуктів PRP-технологій [148, 198, 211, 212].

Загалом, більша частина представлених досліджень виконана на клінічно здорових тваринах, у яких моделювали ту чи іншу патологію. Проте, за клінічного застосування PRP та PRF у пацієнтів зі зниженим

регенеративним потенціалом, загальний стан їх не завжди буває задовільним, адже захисні та регенеративні механізми організму можуть бути суттєво зниженими за дії низки чинників: метаболічних хвороб, остеопорозу, діабету. Поряд з цим, наприклад, невеликий об'єм м'яких тканин у ділянках передпліччя чи гомілки у разі застосування конструкцій для остеосинтезу при закритті операційної рани створює умови додаткового некрозу тканин внаслідок надмірного їх натягу, що, у свою чергу, сприяє погіршенню кровообігу та розвитку ускладнень. Зазначені чинники нерідко зумовлюють виникнення дисрегенеративних процесів у ділянці травми чи навіть у кістковій системі, що призводить до втрати кісткою регенеративного потенціалу [3, 5, 6, 8].

Відомі поодинокі публікації, де все ж описані дослідження впливу факторів росту речовин, концентруючих тромбоцити, на клінічно хворих пацієнтів, зокрема, з наявними інфекційними процесами чи іншими патологіями [87, 148, 213]. Головним принципом застосування у клінічній практиці PRP-технологій вважається наявність у тромбоцитарному концентраті достатнього і оптимального рівня клітин. Дослідження концентрації тромбоцитів близько 1 млн/мкл здебільшого є найбільш оптимальним, але за її рівня більше 5 млн/мкл спостерігається гальмування ангиогенезу [214].

У ветеринарній медицині тромбоцитарні маси першого та другого покоління для різних видів тварин здебільшого апробовують у дерматології, травматології та офтальмології.

У серії досліджень, на кроликах [82, 215–217], застосовували фібрин у комбінації з іншими матеріалами (кремнієм з аутологічною кістковою тканиною, сімвостатином, оксидом цинку, тканиною зубів, імплантатами з металу), що посилювало регенерацію кісткової тканини черепа, пародонту, дефектів ліктьових кісток та гомілки. Так, заповнення PRF періімплантного простору збільшувало інтеграційні властивості імплантів. Дефекти кісткової тканини, сформовані в ліктьових кістках, після заповнення PRF та

наночасточками оксиду цинку регенерували з достатньою кількістю та якістю сформованого регенерату. Проте менш ефективним виявилось самостійне використання фібрину, збагаченого тромбоцитами. Тобто, комбіноване застосування PRF дає кращі результати, порівняно з монокомпонентним його використанням, для загоєння дефектів кісткової тканини та забезпечує формування більш щільного остеоїду, збільшує швидкість та об'єм новоутвореної кісткової тканини. Однак [218] комбінація ксенотрансплантату з PRF в якості мембрани для загоєння дефектів кісток черепа у кролів не впливала на рівень формування кісткової тканини, а при заповненні дефектів великогомілкових кісток PRF спостерігали [219] тимчасовий негативний вплив на мікроархітектуру кістки у період раннього остеогенезу.

Порівняльна оцінка загоєння хрящових дефектів, сформованих у колінних суглобах кролів [220], засвідчила, що PRF підвищує активність хондроцитів та покращує регенерацію хрящової тканини, порівняно з PRP. У цього ж виду тварин описаний [221] позитивний вплив фібрину, збагаченого тромбоцитами, на загоєння рани кон'юнктиви, де він виконував функцію матриці для мігруючих клітин.

Найбільш широкого за використання PRF і PRP отримало у собак. Для загоєння губчастої кісткової тканини, зокрема тканин пародонту [85, 87, 222–224] застосовували аутологічний та ксенологічний PRF самостійно, що виявилось більш ефективно, порівняно з контрольною групою без PRF та у комбінації PRF з 17% розчином ЕДТА. Достатньо ефективним виявився PRF та його поєднання з кістковим мозком [56 466 626 225] за переломів променевиких кісток та після остеотомії у собак, за дисплазій.

Також відомо про позитивний вплив підшкірних ін'єкції PRP чи аплікацій PRF тромбоцитарних мас на загоєння ран шкіри у собак [226–228], зокрема також інфікованих [213].

Застосування PRF і PRP за ушкоджень хрящової тканини включало використання мезенхімальних стовбурових клітин у поєднанні з фібриновою матрицею, що зумовлювало регенерацію її дефекту, модельованого на



медіальних виростках стегнових кісток [229, 230]. Позитивний результат при застосуванні PRF [231] за анастомозу кишечника та [232] для загоєння рогівки після кератокон'юнктивіту, а PRP – для відновлення дефектів шкіри грудної стінки [226].

Однак за травм сухожилків [233] використання фібрину, збагаченого тромбоцитами, не приводило до їх відновлення у собак. Відновлення сухожилків у щурів за використання PRF [234], на відміну від собак [235], одержали позитивний результат.

Низка досліджень [236–239] на щурах дозволила визначити перспективність продуктів PRP-технологій для травматології. За модельованих дефектів черепа і нижньої щелепи, відкритих переломів алотрансплантати з PRF, стовбуровими клітинами,  $\beta$ -трикальційфосфатом, полі- $\epsilon$ -капролактоном суттєво покращували всі стадії репаративного остеогенезу, ніж його самостійне застосування. За поєднання PRF з гідрогелем на основі альгінату та гіалуронової кислоти відмітили динамічне відновлення тканини міокарду [240], а за підшкірного введення PRP – загоєння опіків [241]. При цьому посилювалися епітелізація, синтез колагенових волокон і неоваскуляризація з відновленням фізіологічних особливостей шкіри.

Дослідження на конях включали вивчення впливу плазми, збагаченої тромбоцитами на зрощення сезамовидних кісток [242], відновлення сухожилків [243] та PRF і PRP для загоєння дефектів хрящової тканини [244, 245]. При цьому проводили застосування речовин, що містять підвищений вміст тромбоцитів як самостійного компонента так і в поєднанні з мезенхімальними стовбуровими клітинами. Було встановлено, що комбіноване застосування матеріалів приводить до кращого результату.

Використання PRP і PRF за ран дистальних відділів кінцівок у ослів [115] та хронічних ран шкіри в оленів [160] супроводжувалося потужною епітелізацією та динамічним зменшенням їх площі.

Під час досліджень на вівцях [191, 246] описаний вплив PRF і його комбінації з фосфатом кальцію та PRP із гранулами полілактиду на загоєння

кісткових дефектів. У результаті виникало інтенсивне формування трабекул новоутвореної кісткової тканини від периферії до центру дефекту. А використання PRP для загоєння ран шкіри [151] супроводжувалося зменшенням запальної реакції у ранній період та посиленими процесами епітелізації.

Лікування ран у свиней із використанням PRP та PRF [247] супроводжувалося інтенсивним формуванням грануляційної тканини, посиленою епітелізацією. Подібні зміни виникали і за використання шкірного трансплантату в комбінації з PRF для закриття дефектів [145]. Вплив PRF на загоєння анастомозу кишечника [248] у цього виду тварин характеризувалося утворенням більш зрілого колагену та раннім ангиогенезом досліджуваної ділянки.

Клінічні дослідження проведені у котів свідчать про позитивні результати використання PRF для реконструкції поверхні ока [153] та за кератотомії [152]. Позитивний ефект відмічали за використання фібрину та кісткового мозку з 3D-імплантом для загоєння ороназальної фістули у кішки [154], також відомий випадок [211] загоєння хронічних ран після застосування гетерогенного PRF.

Отже, частка власне клінічного застосування продуктів PRP-технологій досить невелика. При цьому використовувалися такі їх форми як рідина, гель [249], згустки або плівки (мембрани) фібрину [161, 187]. Здебільшого це було місцеве застосування у вигляді ін'єкції [88, 162, 163] чи у поєднанні з іншими матеріалами [155, 191]. Тобто, у ветеринарній медицині недостатня апробація таких матеріалів. Клініко-експериментальні дослідження накопичені в останні роки, хоч і свідчать про позитивний вплив PRF та PRP на репарацію тканин, зокрема хрящової, кісткової, м'яких тканин у різних видів тварин, та все ж є низка дискусійних та неоднозначних результатів.

Плазма, збагачена тромбоцитами, здатна відновлювати м'язову тканину [150], прискорює загоєння ран шкіри [250] та хронічних ран [160], зменшує набряк синовіальної оболонки, тугорухомість суглобів, що свідчить про її

протизапальні та регенеративні властивості [251]. Також повідомляють про позитивний вплив плазми, збагаченої тромбоцитами, на відновлення сухожилків [150]. Використання плазми, збагаченої тромбоцитами, у поєднанні з імплантатами забезпечує відновлення дефектів кісткової тканини [178, 191], за поєднання біоскла і PRP для заміщення кісткових дефектів відмічали підвищення остеоіндуктивних властивостей біоскла. Її комбінація з гідроксиапатитними матеріалами покращувала регенерацію кісток черепа, про що свідчили дослідження на щурах [155], але в деяких дослідженнях не спостерігали особливих переваг при використанні плазми, збагаченої тромбоцитами [57]. Результати лікування кісткових фрактур [252] із використанням плазми і фібрину, збагачених тромбоцитами, також досить розрізнені. Крім позитивних результатів, деякі автори представили експериментальні та клінічні дані, що свідчать про недостатню ефективність чи її відсутність за використання PRP для лікування переломів і їх ускладнень.

Фібрин, збагачений тромбоцитами, використовували для загоєння ран дистальних кінцівок [115]. Він викликає формування великої кількості кровоносних судин [222], сприяє відновленню дефектів періодонту – дослідження на щурах [205], та репарації тканин у депульпованих зубах у собак [86]. Зокрема, є перші повідомлення про його застосування у ветеринарній стоматології для заміщення дефектів кісткової та м'яких тканин після екстракції чи за імплантування зубів у собак [62, 85], а також у клінічній травматології та ортопедії за переломів довгих трубчастих кісток [5, 253], що однак потребує подальших досліджень та всебічного обґрунтування.

Деякі дослідження не продемонстрували переваг використання фібрину, збагаченого тромбоцитами, у поєднанні з депротеїнізованим кістковим матеріалом для загоєння кісткових дефектів [176]. Водночас, його поєднання з іншими матеріалами дає кращі результати відновлення кісткових дефектів у кролів, ніж використання кожного з них окремо [253].

Доклінічне вивчення цих аутобіоматеріалів може стати підґрунтям до клінічного застосування тромбоцитарних концентратів першого та другого

поколінь у ветеринарній медицині. Тому для оцінки ефективності PRP та PRF необхідно вивчати їх вплив на тваринах у яких вже присутній певний патологічний процес, та які дійсно потребують корекції регенеративних властивостей у різних тканинах, що буде наближено до клінічного стану пацієнтів [148]. При цьому важливо застосовувати для об'єктивної оцінки здатності до індукції регенеративних процесів ідентичні методики одержання, шляхи введення, комбінування з однаковим матеріалом для відновлення тканин одного типу, але у різних видів тварин.

#### **1.4. Висновок з огляду літератури**

Існує низка чинників, які сприяють виникненню переломів у тварин – це умови утримання, годівля, гормональний статус організму, генетичні аномалії а також вплив різноманітних травмуючих чинників, які викликають ушкодження системи кістково-суглобового апарату, що часто при цьому включають травмування різних типів тканин. Проте існують випадки коли необхідно проводити корекцію регенеративних властивостей, адже інколи за певних обставин виникає зниження тканинного регенеративного потенціалу. Зокрема, за переломів, які супроводжуються кістковими дефектами. При цьому виникає необхідність їх заміщення, однак незважаючи на загал остеозаміщувальних матеріалів, останні мають переважно остеокондуктивні властивості. Засоби регенеративної медицини здатні забезпечити остеоіндуктивні властивості, шляхом застосування стовбурових клітин, кісткових морфогенетичних білків, та PRP-технологій.

Наразі їх застосування обмежене за низки причин: вартості, формуванні додаткової травми у місці забору матеріалу, тривалості його підготовки та етичних чинників. Однак, відомі матеріали, виготовлені з крові пацієнта, що теж здатні стимулювати регенеративні процеси. Вони містять підвищену концентрацію тромбоцитів, а останні у  $\alpha$ -гранулах – низку факторів росту, які беруть участь у запаленні, синтезі колагену та ініціації ангиогенезу. Їх

одержання просте та малоінвазивне, а використання доволі перспективне, як свідчать доклінічні дослідження.

PRF та PRP одержуються за різними технологіями, далі комбінують з низкою матеріалів і у кінцевому результаті набувають неоднорідних властивостей: здатності до індукції, інтеграції, кондуктивності. Їх застосування теж доволі розрізнене навіть в межах тварин одного виду та тканин одного типу. Також не має достовірного патохімічного обґрунтування за використання PRF та PRP у цільових тварин [160].

Проте, незважаючи на велику кількість публікацій стосовно використання PRP та PRF остеозаміщення, їх клініко-патогенетичне обґрунтування залишається мало вивченими у травматології та ортопедії тварин, виникають суперечності щодо їх ефективності, що потребує подальших досліджень. Детальне вивчення та узагальнення їх властивостей може бути перспективним для застосування у ветеринарній медицині.

## РОЗДІЛ 2

### ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

#### 2.1. Методологія та схеми досліджень

Робота виконана впродовж 2018–2022 років на кафедрі хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету. Матеріалом для дослідження були кролі, яких утримували у віварії, та собаки з переломами кісток, які надходили в навчально-науково-виробничу міжкафедральну клініку коней, жуйних, свиней, дрібних та екзотичних тварин факультету ветеринарної медицини Білоцерківського НАУ. Етапи проведених досліджень відображено на рис. 2.1, а їх об'єм – у табл. 2.1.

Дослідження проводили в межах програми підготовки доктора філософії (2018–2022 рр.) та науково-дослідного проекту «Доклінічні дослідження виробів з розроблених біоматеріалів» (договір № 48/1 від 27.08.2019 р.) у межах завдань науково-технічної державної теми «Розробка та доведення до впровадження в клінічну практику кісткових імплантатів різного призначення з новітніх біоматеріалів для відновлення кісткової тканини та функції кісток після поранень в бойових діях» № 0119U102083 НАН України, в якій автор виконувала підрозділ «Обґрунтування використання кальцій-фосфатної кераміки з PRF».

Відомо [39, 103, 253–255], що переломи кісток, зокрема за наявності осколків і значних дефектів кісткової тканини [36, 255, 256], супроводжуються порушеннями локальної гемоциркуляції, які лімітують репаративний потенціал кісткової тканини. Це, в свою чергу, сприяє збільшенню об'єму деструктивних змін, розвитку інфекційно-запальних та імунопатологічних процесів у травмованих тканинах, ступінь яких залежить від складності травми і впливає на характер консолідації переломів та динаміку перебігу її стадій. При цьому унікальну патогенетичну роль у біології репаративного

остеогенезу відіграє гематома зони перелому, оскільки вона є первинним джерелом цитокінів, остеогенних клітин і факторів росту [64–66], тобто виконує функцію пускового механізму кісткової консолидації. Однак надлишковий об'єм кісткової гематоми чи його недостатність безпосередньо призводять до дисрегенерації травми кісткової тканини [131]. За репозиції кісткових уламків, остеосинтезу та первинної хірургічної обробки порушується фіксація первинно сформованого кров'яного згустка, що забезпечує контакт країв кісткової травми [64–67], чим обмежується реалізація механізмів ендоостальної та інтрамембранної осифікації.

Отже, незважаючи на здатність кісткової тканини до утворення абсолютно ідентичної аутологічної структури у місці пошкодження, існує необхідність у створенні низки умов [110] для оптимізації репаративних процесів. З цією метою використовують різноманітні біологічні матеріали з остеоіндуктивними та остеокондуктивними властивостями [132].

В зв'язку з цим як у гуманній, так і у ветеринарній ортопедії, перспективним за осколкових переломів, як найскладніших їх форм, вважається [53, 133] остеозаміщення, спрямоване на комплексне забезпечення відновлення механізмів остеорепаративних процесів. Цілком передбачуваним є те, що включення до остеозамішувальних кальцій-фосфатних матеріалів структурних елементів «природної гематоми» – PRF, може надати їм суттєвих остеогенних властивостей [136, 257] для оптимізації репаративного остеогенезу.

Технології виготовлення PRP та PRF ґрунтуються на центрифугуванні крові, внаслідок чого її активні компоненти концентруються у певних ділянках центрифугату. Водночас неповна характеристика протоколів приготування PRF, відсутність чіткої цито- і гістоструктури різних його ділянок [258] спонукають до їх оптимізації [180].

З огляду на вище зазначене, робота виконувалася у кілька етапів. На **першому етапі** досліджень встановлювали оптимальні режими центрифугування за визначенням цитологічно і гістологічно ділянок



Рис. 2.1. Етапи проведених досліджень



Таблиця 2.1

**Об'єм виконаних досліджень**

№ п/п	Дослідження	Кіль- кість голів/ зразків
1.	Оптимізація режимів центрифугування	55/55
2.	Моніторинг впливу різних типів тромбоцитарних концентратів на репаративний остеогенез у кролів у компактній та губчастій кістковій тканині (PRP, PRF, i-PRF, ксенологічний PRF, PRF+HA/β-TCP-700): – клініко-рентгенологічне дослідження – макроморфологічне дослідження – гістоморфологічне дослідження	72/144 72/144 72/288
3.	Гематологічні дослідження (морфологічні та біохімічні показники) у клінічно здорових кролів і за використання різних типів тромбоцитарних концентратів у компактній та губчастій кістковій тканині (PRP, PRF, i-PRF, ксенологічний PRF, PRF+HA/β-TCP-700) за репаративного остеогенезу в умовах модельних переломів	84/372
4.	Гематологічні дослідження (кісткові біомаркери, морфологічні та біохімічні показники) за лікування осколкових переломів у собак із застосуванням PRF, i-PRF та PRF+HA/β-TCP-700, у порівнянні із контрольною групою	30/180

концентрування клітин різних типів у зразках аутологічних плазми і фібрину, збагачених тромбоцитами.

До тепер розроблена значна кількість методик приготування PRF, з використанням комерційно доступних автоматичних приладів чи за допомогою лабораторних центрифуг, що зумовило виникнення безлічі його

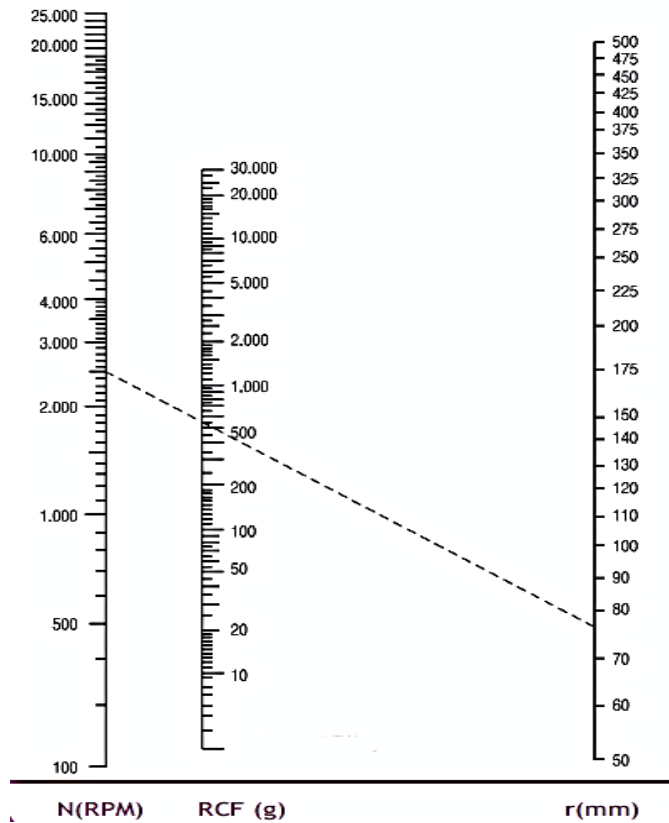
форм: P-PRF, L-PRF, A-PRF, I-PRF, T-PRF [88]. Їхня основна відмінність полягає у зміні часу центрифугування, його швидкості та матеріалах, з яких виготовлені пробірки для відбору зразків крові [164, 182]. Властивості цих біологічних продуктів відрізняються, а тому по-різному впливають на процеси регенерації [162, 163]. При цьому об'єктивність їх оцінки ускладнена недостатньою інформативністю щодо протоколів приготування продуктів PRP-технологій.

Ключова процедура усіх методик одержання PRP-матеріалів – центрифугування, параметри якого впливають на біологічні властивості зазначених біоматеріалів. При цьому, здебільшого пропонується відбирати кров у об'ємі не менше 10 мл та центрифугувати 8–12 хв. Водночас ін'єкційний I-PRF готують за низької відносної відцентрової сили центрифугування – у межах 100 g протягом 2–3 хв, у результаті чого утворюється рідка фракція, що поступово протягом декількох хвилин полімеризується.

У зв'язку з цим у ветеринарній медицині постає необхідність модифікації та уніфікації методів підготовки тромбоцитарних мас через, як правило, обмежені об'єми крові, особливо у дрібних тварин (собаки малих порід та коти, лабораторні та екзотичні тварини), оскільки нерідко відбір 10 мл за певних умов може бути критичним для здоров'я пацієнтів [259].

За моніторингу методик приготування PRF (табл. 2 розділ 1) виявили суттєві розбіжності у показниках відцентрової сили (g). Зважаючи на це, у дослідженні з оптимізації протоколів приготування PRP-матеріалів використали низку параметрів g для центрифугування. Для уніфікації і можливості використання різних типів центрифуг користувалися конверсійною нормограмою (рис. 2.2). З її допомогою можна визначити величину відцентрової сили для конкретної центрифуги, яка залежить від радіуса ротора та швидкості обертання, так і, навпаки, кількість обертів за хвилину за відомої відцентрової сили.

Оскільки підрахунок кількості тромбоцитів у згустках PRF досить трудомісткий, то її визначали у плазмі, збагаченій тромбоцитами, шляхом



$$RCF = 0,000001118 \times r \times N^2$$

RCF (relative centrifugal force) –

відносна відцентрова сила (g)

r – радіус від центру ротора до  
дна пробірки (мм)

N – rotating speed (RPM) –  
швидкість обертання (об/хв)

Рис. 2.2. Конверсійна номограма ([www.djblabcare.co.uk/RCF](http://www.djblabcare.co.uk/RCF))

одноразового центрифугування за різних величин відносної відцентрової сили, які потім використовували для одержання PRP (рис. 2.3).

Однак, тут слід взяти до уваги, що ділянки концентрування тромбоцитів у PRP неможливо екстраполювати на зони розміщення тромбоцитарних мас у PRF, оскільки за одержання останнього відбувається їх зміщення внаслідок полімеризації фібрину, що потребує його гістологічного дослідження.

Для одержання PRP у кролів (n=25) з яремної вени відбирали зразки стабілізованої 3,8 % розчином цитрату натрію крові (1:9) об'ємом 5 мл. Їх відразу центрифугували за відносної відцентрової сили 100 g протягом 3 хв, а за 400, 735, 906 та 1843 g – 10 хв (рис. 2.4). Для кожної величини відцентрової сили використали по 5 зразків стабілізованої крові.

Після центрифугування зразки крові розподілялися на фракції: у нижній частині знаходилися еритроцити, над ними – лейкоцитарний шар, а ще вище – плазма, збагачена тромбоцитами та ще над нею – безклітинна плазма. Для

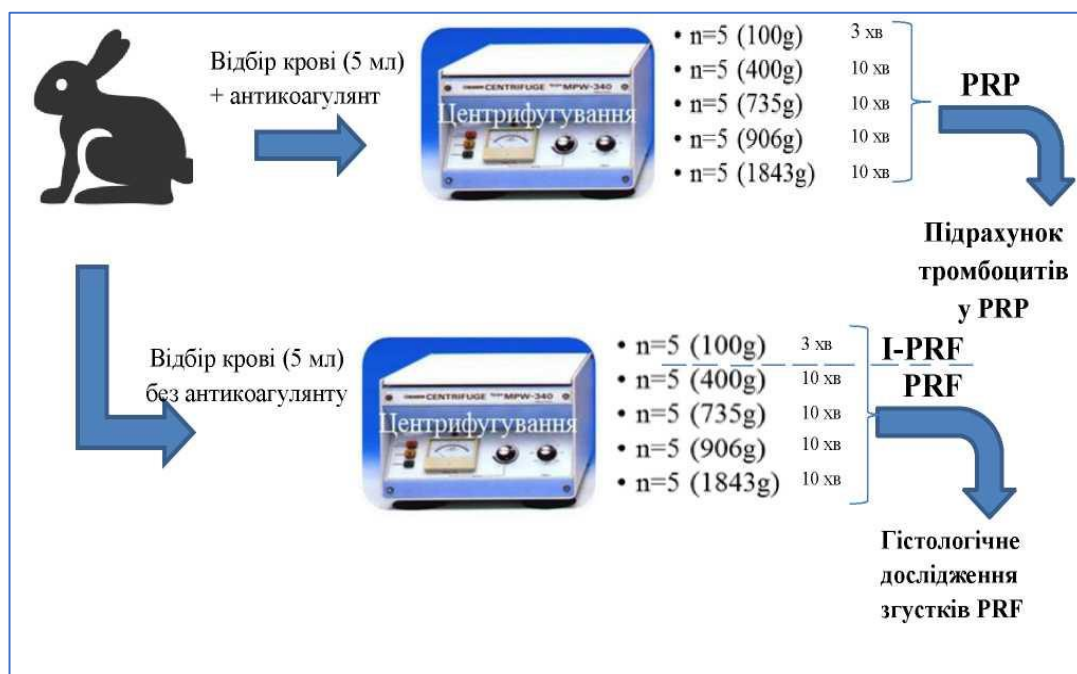


Рис. 2.3. Схеми процедур одержання плазми та фібрину, збагачених тромбоцитами

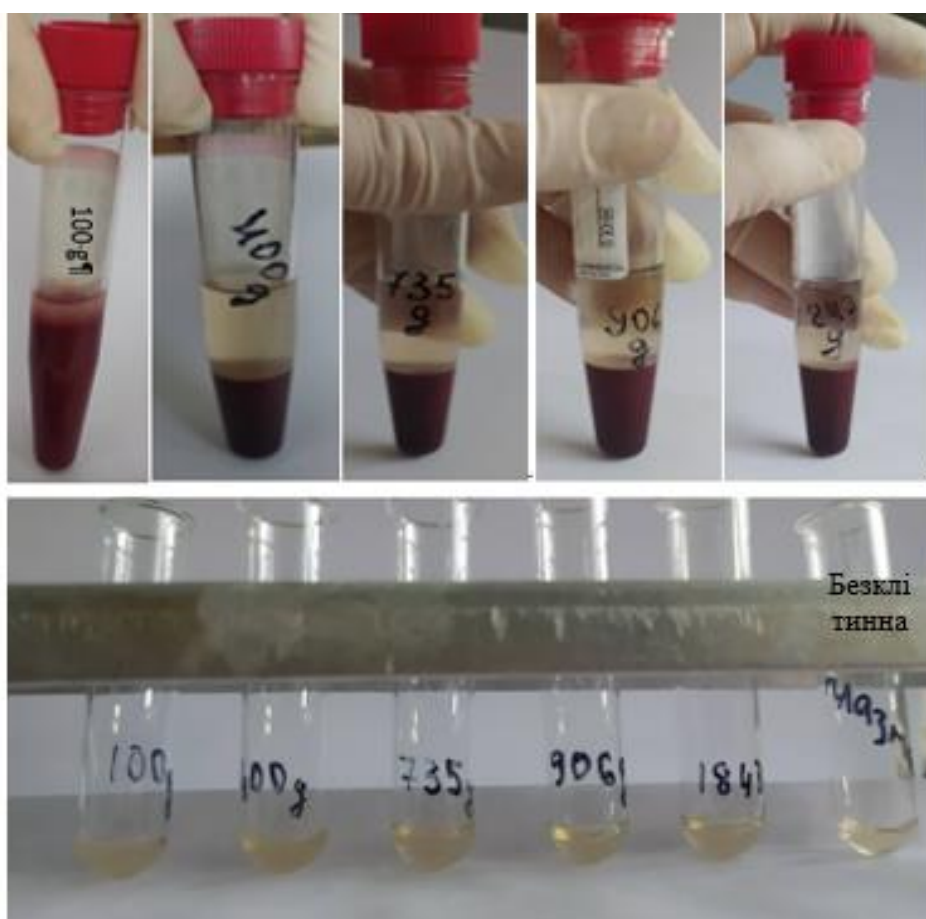


Рис. 2.4. Зразки плазми за різних параметрів центрифугування

одержання власне тромбоцитарного концентрату шприцом відбирали шар плазми 0,5 мл над лейкоцитарним концентратом і проводили підрахунок тромбоцитів за допомогою камери Горяєва. Додатково зі зразків плазми виготовляли мазки, їх фіксували і фарбували набором Leucodif-200 та проводили мікроскопію для візуального порівняння кількості тромбоцитів за різних параметрів центрифугування крові. Окремо, у здорових кролів (n=5), відбирали зразки стабілізованої 3,8 % розчином цитрату натрію крові (1:9) об'ємом 5 мл для підрахунку кількості тромбоцитів.

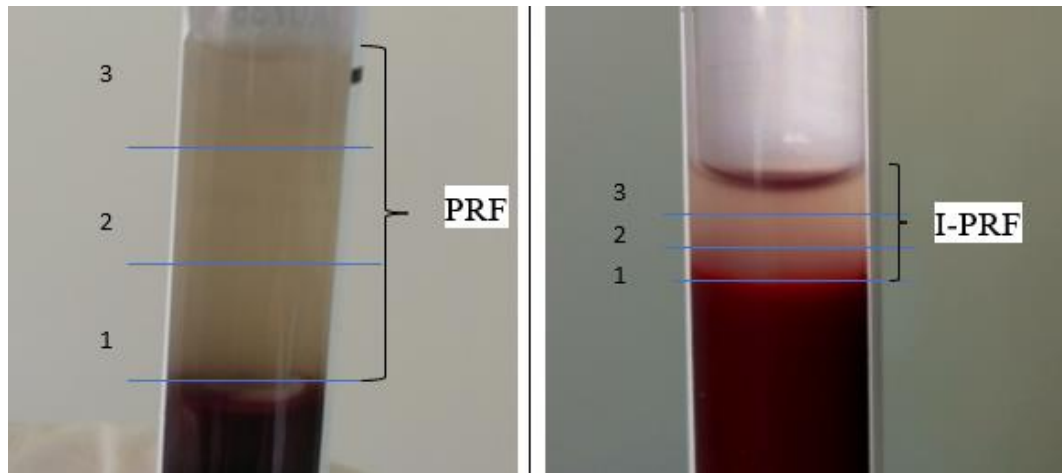
Для одержання PRF та i-PRF у кролів (n=25) відбирали кров об'ємом 5 мл у пробірки без антикоагулянту, яку центрифугували за різних величин відносної відцентрової сили: 100 g, 400 g, 735 g, 906 g, 1843 g. Для приготування (так званого щільного) PRF зразки крові відразу центрифугували протягом 10 хв на центрифугу MPW-340 (Польща). Під час приготування i-PRF, з метою недопущення полімеризації фібрину (тобто його згортання), час центрифугування складав 3 хв. Усі маніпуляції виконувалися із дотриманням правил асептики та антисептики.

Сформовані згустки PRF відділяли від еритроцитарної маси та візуально ділили на 3 частини для подальшого дослідження: 1-а – на межі з еритроцитарною масою, 2-а середня частина PRF, 3-я – верхівка згустка (рис. 2.5).

За приготування I-PRF рідка частина зразка крові після процедури центрифугування візуально розділялася на три шари (рис. 2.5): 1-й мав червонувате забарвлення і безпосередньо межував з еритроцитарною масою; 2-й – червонувато-жовтий, над 1-им та 3-й – жовтий, самий верхній. Два шари останні займали близько 2/3 об'єму кров'яного центрифугата. З кожного шару відразу після центрифугування відбирали автоматичною піпеткою по 0,2 мл цього центрифугата і вносили в окремі пробірки, де відбувався процес повної полімеризації фібрину та утворення його згустків, які далі досліджували гістологічно щодо клітинного складу.

Згустки обох форм фібрину фіксували у 10 % розчині формаліну, після

чого промивали водою, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації



**Рис. 2.5. Структура згустків PRF та i-PRF: 1 – нижня, 2 – середня, 3 – верхня частини згустка**

та заливали у парафін, лінійкою вимірювали їх довжину. Парафінові зрізи отримували на ротаційному мікротомі та фарбували гематоксилином і еозином. Далі їх аналізували за допомогою мікроскопа фірми ZEISS з цифровим фотоапаратом Canon G5 та комп'ютерної програми Zoom Browser.

**Другий етап** дослідження передбачав вивчення впливу різних форм тромбоцитарних концентратів і PRF у комбінації з кальцій-фосфатною керамікою на репаративний остеогенез за модельних дірчастих переломів губчастої і компактної кісткової тканини у кролів.

При цьому враховували, що матеріали, які використовують для остеозаміщення, повинні володіти певним переліком властивостей, а саме: остеокондуктивними, osteointegraційними, osteoіндуктивними, osteoгенними та бути біосумісними і нетоксичними [45, 46]. Біоактивна кераміка на основі гідроксиапатиту за рахунок подібності свого складу до мінерального компонента кісткової тканини вважається найперспективнішою [260]. Ключовою в цьому разі вважається osteoіндуктивність, яка досягається локальним застосуванням як фармакологічних засобів, так і аутологічних біоактивних речовин. Ефективність впливу на репаративний остеогенез

тромбоцитарних концентратів ґрунтується на дії значної кількості факторів росту, які містять  $\alpha$ -гранули тромбоцитів [118]. Ці фактори здатні індукувати регенерацію тканин за рахунок інфільтрації, росту, диференціювання, міграції та апоптозу клітин [71, 182, 183].

Оскільки різні типи тромбоцитарних мас чи їх комбінація з керамікою на основі гідроксиапатиту можуть мати різний ступінь реалізації репаративних властивостей, то сформували контрольну і 5-ть дослідних груп кролів по 12 гол у кожній, у яких моделювали дірчасті дефекти у двох типах кісткової тканини кожної тварини: губчастій речовині – гребінь великогомілкової кістки з медіального боку, та компактній – середина діяфізу променевої кістки на дорсо-латеральній поверхні передпліччя. Оперативне втручання виконували з дотриманням вимог асептики та антисептики. Анестезіологічне забезпечення включало: внутрішньом'язово 2 % розчин ацепромазину (0,5–1,0 мг/кг), внутрішньовенно тіопенат (5–8 мг/кг) та місцево інфільтраційну анестезію 0,5 % розчином лідокаїну (3–4 мг/кг). Після знеболювання розсікали окістя та свердлом ( $d=3$  мм) формували дірчасті дефекти, які у тварин (рис. 2.6) 1-ї



Рис. 2.6. Етапи заповнення кісткових дефектів: а – і-PRF; б –PRF; в – PRF у поєднанні з гранулами гідроксиапатиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом

дослідної групи заповнювали PRP, 2-ї – PRF, 3-ї – i-PRF, 4-ї – ксенологічним PRF, отриманим з крові овець, 5-ї – PRF+ГТβ-700, а контрольної групи (n=12) залишали загоюватися під кров'яним згустком. Рани м'яких тканин закривали вузловими швами, які двічі на добу протягом п'яти діб обробляли антисептиком йоддицирином. У післяопераційний період за тваринами вели клінічні спостереження. Шви знімали на 7-му добу.

Поряд з цим у тварин усіх груп проводили комплекс гематологічних, біохімічних, рентгенологічних, макро- і гістоморфологічних досліджень. Оскільки для зазначених біохімічних показників немає референтних значень, то додатково сформували групу із клінічно здорових кролів (n=12).

Після виникнення кісткової травми відбуваються посттравматичні зміни не тільки у місці її локалізації, а й системно, що характеризується анемією, розвитком запалення. Оскільки гемостаз тісно пов'язаний із розвитком запальної реакції та здатний активувати лейкоцитоз, коагуляцію і каскадні реакції у системі комплементу, як наслідок може виникати не тільки дезорганізація мікроциркуляції у тканинах, а й системне порушення гемодинаміки. Це зумовлює необхідність оцінки реакції крові за використання різних остеозаміщувальних матеріалів, у зв'язку з чим визначали в динаміці репаративного остеогенезу низку гематологічних показників – еритроцити, лейкоцити, тромбоцити і гемоглобін.

Індукція процесів ангіогенезу відбувається оксидом азоту за рахунок експресії клітинами ендотелію інтерлейкінів та інтегринів, що забезпечує формування сітки судинних каналців у зоні кісткової травми та впливає на мікроциркуляцію, за рахунок посилення синтезу тканинного активатора плазміногену в крові. В свою чергу продукція колагену I типу значною мірою залежить від оксигенації ділянки кісткової травми, що відіграє ключову роль у репаративному остеогенезі. Виходячи з цього у сироватці крові визначали оксиду азоту (NO) методом Гріна [261] у модифікації Голікова [262].

Цитокіни та фактори росту тромбоцитарних концентратів можуть мати не лише місцевий, а й системний вплив на організм, а інтенсивність запальної



реакції відображає гаптоглобін, що відноситься до головних білків гострої фази у кролів, рівень якого у сироватці крові також визначали в динаміці репаративного остеогенезу.

Поряд з цим для контролю репаративних процесів [263] визначали типові маркери метаболізму кісткової тканини: остеогенезу – кістковий ізофермент лужної фосфатази, тому що остеогенна активність остеобластів у зоні сформованого дефекту зумовлює елімінацію кісткового ізоферменту лужної фосфатази в кровоносне русло; остеорезорбції – тартрат-резистентну кислоту фосфатазу, оскільки кисневі сполуки остеокластів зумовлюють руйнування матричних компонентів кістки, а продукти її деградації разом із тартрат-резистентною кислотою фосфатазою виділяються в кров і відображають ступінь резорбції кісткової тканини [70, 264].

Одним із показників активації системи згортання крові є наявність у циркулюючій крові розчинного фібрину (РФ), що свідчить про тромбінемію [265]. Поява тромбіну в крові – це не тільки активація каскадно-коагуляційного процесу, але й стимуляція тромбоцитів з вивільненням і зв'язуванням на поверхні клітин фібронектину та фібриногена, які посилюють формування фібрину та сприяють його організації. Поряд з цим в організмі процеси тромбоутворення постійно контролюються системою природних антикоагулянтів, до якої відноситься антитромбін-III (АТ-III) [266, 267] – серинова протеїназа, яка забезпечує 75% антитромбінового потенціалу плазми крові. Стан цих процесів відображають рівень у плазмі крові РФ та активність АТ-III.

Разом з тим кількість загального білку та альбуміну, до певної міри, відображають стан і характер анаболітичних процесів регенерації [268], а кальцій (Са) і фосфор (Р) – мінерального обміну [269].

Кров у кролів усіх груп відбирали із зовнішньої яремної вени до анестезії та на 3-ю, 7-му, 14-ту, 21-шу і 42-гу добу репаративного остеогенезу. Рентгенологічне дослідження проводили на 14-ту, 21-шу та 42-гу добу. Для макро- і гістоморфологічного дослідження кісткових регенератів, тварин

виводили з досліду на 14-ту, 21-шу та 42-гу добу шляхом внутрішньовенного введення тіопенату в дозі 50 мг/кг.

**Третій етап** досліджень передбачав клініко-експериментальне обґрунтування застосування PRF та його композиту з гідроксиапатитною керамікою для оптимізації репаративного остеогенезу за переломів довгих трубчастих кісток у собак.

Було сформовано контрольну та дві дослідні групи тварин, у кожену з яких входили пацієнти з переломами як плечових, так і кісток передпліччя, собаки з осколковими (n=20) та з безосколковими переломами (n=10). За останніх був частково утрачений зв'язок кісткових уламків із м'якими тканинами, діастаз між кістковими уламками внаслідок ретракції і спазму м'язів виявився більше 3 мм або ж по лінії перелому вони мали невеликі кісткові дефекти, що в цілому є факторами ризику ускладненого перебігу репаративного остеогенезу.

Критеріями відбору тварин в групи були: термін отримання кісткової травми – не більше двох діб; локалізація кісткової травми у ділянці діафіза чи епіфіза; маса тіла тварин – 8–15 кг.

Наявність перелому встановлювали за клінічними ознаками та рентгенологічно на рентгенапараті РУМ-20 у відповідності до уніфікованих для кісток собак параметрів напруги і експозиції рентгенівських променів. Одержані рентгензнімки до остеосинтезу та на 21-шу і 42-гу, 50-ту і 60-ту добу відцифрували на електронний носій (AGFA. Healthcare N.V. CR 10-X, Німечина).

Анестезіологічне забезпечення за остеосинтезу включало внутрішньом'язове введення медетомідину (20 мкг/кг, медісон, Бровафарма), буторфанолу тартрат (0,1 мг/кг, бутолар зоо) та для підтримання анестезії внутрішньовенно тіопенталу натрію (7 мг/кг, тіопенат, Бровафарма). Місцево проводили інфільтраційну анестезію 0,5 % розчином лідокаїну (3 мг/кг).

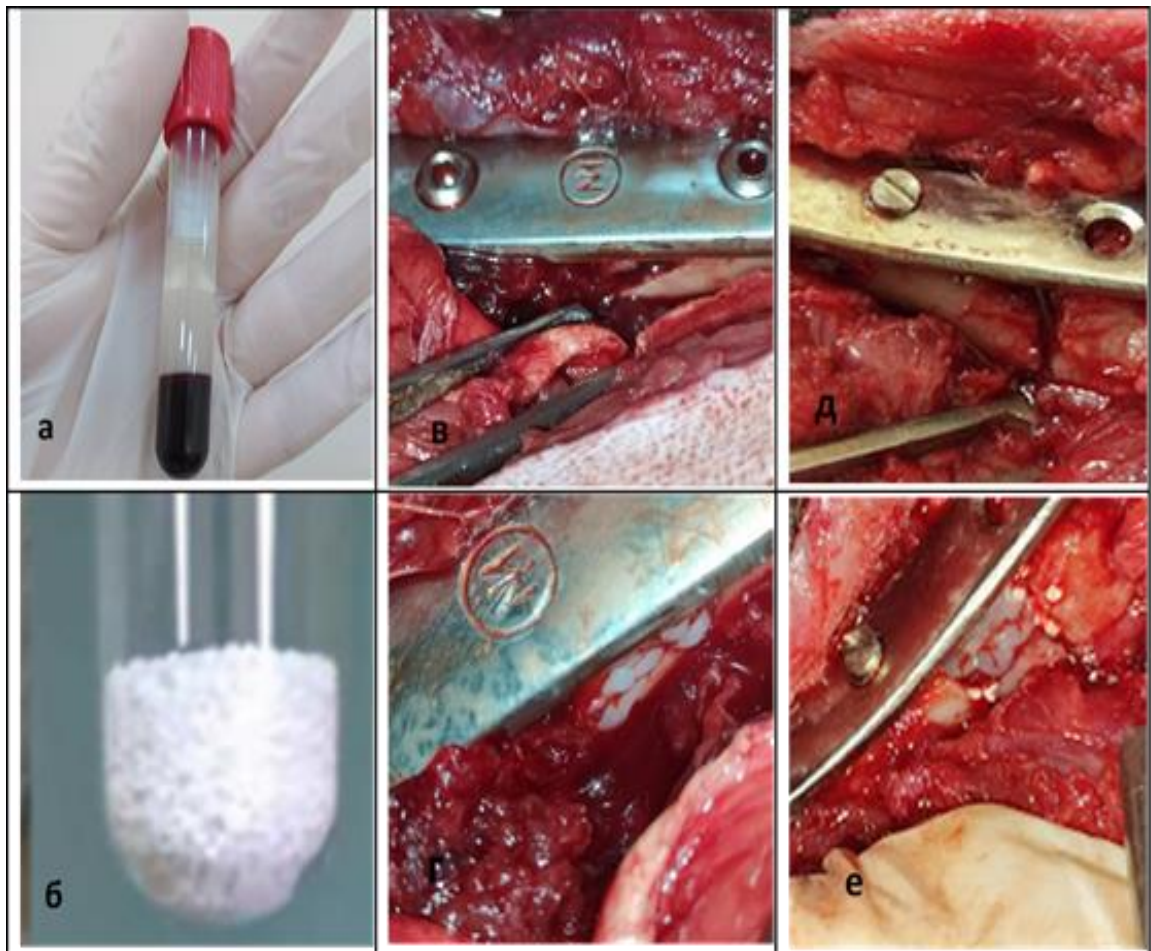
Оперативний доступ до ділянки перелому виконували на латеральній поверхні плечової кістки та дорсо-латеральній у ділянці передпліччя. Після

видалення нежиттєздатних осколків гравіметрично визначали об'єм кісткового дефекту шляхом заповнення його порожнини пластичною масою альгінату натрію (порошок альгінату змішували із стерильним 0,9 % розчином NaCl у співвідношенні 1:2 за температури 23 °C), яку після затвердіння вилучали з дефекту та поміщали у мірний циліндр з водою. За об'ємом витісненої води встановили, що в першій дослідній групі об'єм дефекту становив  $1,3 \pm 0,07$  см<sup>3</sup>, а у другій –  $2,01 \pm 0,09$  см<sup>3</sup>. У контрольній та 1-й дослідній групах було порівну собак з осколковими та неосколковими переломами, а у 2-й – тільки з осколковими. Далі виконували екстракортикальний остеосинтез пластиною із нелегованого титанового сплаву фірми НП ООО „Інмед”, (Україна). У першій дослідній групі за наявності осколків їх заміщували PRF, а за їх відсутності на лінії перелому вносили і-PRF. У другій дослідній групі проводили остеозаміщення комбінацією PRF з гідроксиапатитною керамікою (рис. 2.7). У контрольній групі дефекти та ділянки діастазу залишали не заповненими. У операційну рану встановлювали дренаж із поліпропіленової трубки, а її ушивали вузловим швом, який двічі на день обробляли йоддицирином. Дренаж знімали на 2–3-ю добу після припинення виділення серозного ексудату. У післяопераційний період тваринам призначали курс антибіотикотерапії (цефтріаксон 20 мг/кг двічі на добу протягом 7-и діб).

У післяопераційний період клінічні дослідження проводили за критеріями наявності та інтенсивності набряку тканин, термінів початку опирання на травмовану кінцівку, повного відновлення її функції та рентгенологічно підтвердженої консолідації перелому.

Для загального гематологічного аналізу (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, гемоглобін) і біохімічних досліджень (NO,  $\alpha_2$ -макроглобуліну, гаптоглобіну, активність загальної лужної фосфатази (ЛФ) та її кісткового ізоферменту (КЛФ), тартрат-резистентної кислої фосфатази (ТрКФ), кількість загального білку, Ca, P, альбуміну, АТ-III, РФ) проби крові відбирали після травми не

пізніше 24-х годин та на 3-ю, 7-му, 14-ту, 21-шу і 42-гу добу після остеосинтезу.



**Рис. 2.7. Матеріали і процедури остеозаміщення кісткових дефектів:**  
 а – PRF; б – гранули гідроксиapatиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом; в, д – кісткові дефекти; е – картина заміщення у першій дослідній групі, ф – остеозаміщення у другій дослідній групі собак

Оскільки для зазначених біохімічних показників немає референтних показників, то додатково сформували групу із клінічно здорових собак (n=10), що надходили в клініку дрібних домашніх тварин Білоцерківського НАУ для проведення планової вакцинації, у яких за згодою власників відбирали зразки крові.

## 2.2. Характеристика використаних матеріалів та методи дослідження

Дослідження проводили на кролях 6 міс. віку, Каліфорнійської породи, з масою тіла 2,5–3 кг. Тварин утримували у віварії Білоцерківського НАУ, в індивідуальних клітках з комбінованим освітленням і щоденним прибиранням. Годівля забезпечувалася комбікормом торгівельної марки «Селевана» (Київська область, м. Бориспіль) із розрахунку 200 г на голову на добу та необмеженим доступом до води.

Овець, у яких відбирали кров для приготування ксенологічного PRF, утримували у віварії Білоцерківського НАУ в стійлах з нормами площі на одну голову не менше 2 м<sup>2</sup>. Підлога була вистелена соломною, напування здійснювалося з автоматичних поїлок, 4 разова годівля включала даванку грубих, концентрованих кормів та силосу.

В роботі були використані 3-и типи аутологічних речовин, які містять в собі підвищену концентрацію тромбоцитів, різняться за характеристиками і методами одержання (рис. 2.8), ксенологічний фібрин, збагачений тромбоцитами, а також гранули кальцій-фосфатного матеріалу, розробленого у відділі фізики міцності і пластичності матеріалів (зав. відділу Фірстов С.О., Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України, м. Київ).

**Плазму, збагачену тромбоцитами,** готували до проведення оперативного втручання шляхом відбору крові з яремної вени кролів, об'ємом 5 мл з яремної вени в стерильну пластикову пробірку з антикоагулянтом (3,8 % цитрат натрію) з подальшим центрифугуванням при (400 g) протягом 10 хв. Плазму над лейкоцитарною плівкою відбирали піпеткою у кількості 0,5 мл, використовували без активації.

**Фібрин, збагачений тромбоцитами.** З яремної вени кролів до оперативного втручання за допомогою шприца відбирали 5 мл крові, яку переносили в пластикову пробірку без антикоагулянту та негайно центрифугували при 3000 об/хв (906 g) протягом 10 хв.

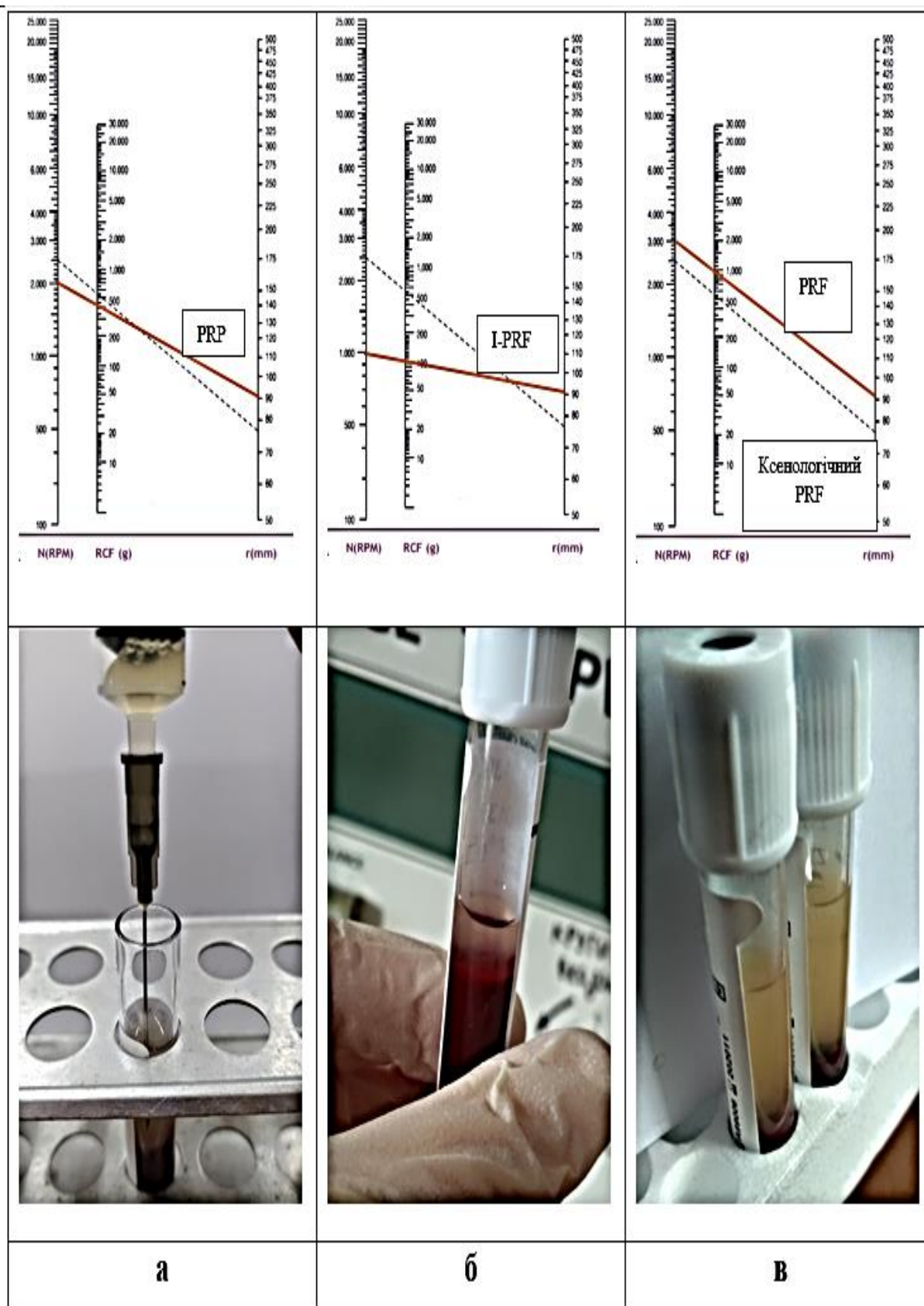


Рис. 2.8. Параметри одержання різних типів тромбоцитарних мас: а – плазма, б – ін'єкційний фібрин, в – фібрин, збагачені тромбоцитами

У результаті в нижній частині пробірки зосереджувалися еритроцити, в середній – згусток фібрину, збагачений тромбоцитами, у верхній – сироватка крові. За допомогою пінцета діставали згусток і відрізали ножицями еритроцитарну масу. Відбирали необхідний об'єм PRF для заповнення кісткового дефекту з нижньої частини згустку (рис. 2.9).

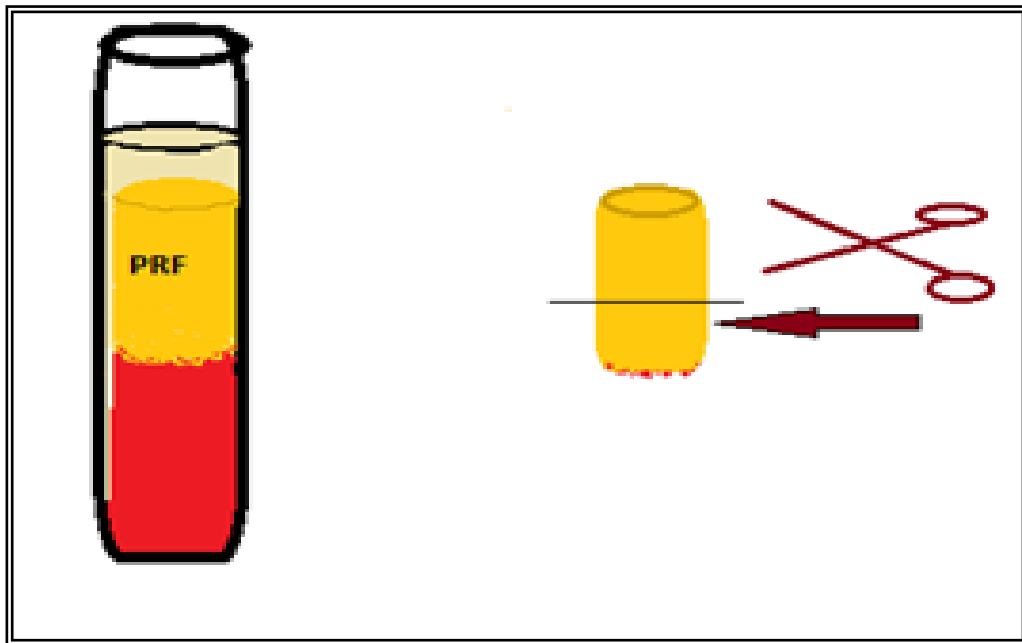


Рис. 2.9. Фібрин, збагачений тромбоцитами, для заповнення модельованого дефекту кісткової тканин (стрілкою вказана частина згустку)

**Ін'єкційний фібрин, збагачений тромбоцитами,** одержували під час проведення оперативного втручання шляхом відбору крові у кролів без антикоагулянту в пластикову пробірку з негайним наступним центрифугуванням при 1000 об/хв (100 g) протягом 2 хв. В результаті отримували рідку форму фібрину, збагаченого тромбоцитами, стерильною піпеткою відбирали 0,5 мл верхнього (жовтуватого) шару і вносили безпосередньо в порожнину кісткового дефекту.

**Ксенологічний фібрин, збагачений тромбоцитами,** одержували від клінічно здорових овець (n=12), з яремної вени яких за допомогою шприца відбирали по 5 мл крові, яку переносили в пластикову пробірку без антикоагулянту та негайно центрифугували при 3000 об/хв (906 g). Ділянку

одержаного згустку, як показано на (рис. 2.9) використовували для заповнення модельованих дефектів кісткової тканини кролів.

Всі процедури отримання тромбоцитарних концентратів проводили з дотриманням правил асептики і антисептики.

**Кальцій-фосфатний матеріал** HA/ $\beta$ -TCP-700, синтезований в Інституті матеріалознавства ім. І.М. Францевича (м. Київ) представляв собою двофазні кальцій-фосфатні гранули у складі 70 % гідроксиapatиту (ГАП) і 30 %  $\beta$ -трикальційфосфату з розміром гранул  $\approx$  700 мкм, адсорбційною активністю 118–120 мг/г.

Макроморфологічну оцінку кісткових регенератів проводили за реакцією губчастої та компактної кісткової тканини на змодельований дефект, періостальною реакцією у вигляді його розростань, формуванням хрящової чи кісткової мозолі, ступенем щільності кісткового регенерата, об'ємом заповнення регенератом змодельованого дефекта та ступенем інтеграції імплантованих гранул кераміки із кістковим регенератом. Запропоновані критерії бальної оцінки макроморфологічної картини регенератів у компактній та губчастій речовині кісткової тканини представлені у таблиці 2.2.

Оскільки об'єктивно оцінити результати репаративного остеогенезу можна лише за якістю сформованого регенерату, що включає клітинний склад, утворення остеїду, остеонів, щільність трабекул та їх будову, з цією метою було проведене гістоморфологічне дослідження. Для цього відбирали зразки кісткового регенерату, проводили їх фіксацію у 10 % розчині нейтрального формаліну, після чого декальцинували розчином (Rapid decalcifier, фірми Kaltek, Італія), зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, далі переміщували у ксилол для просвітлення і заливали в парафін (Plasti Wax, фірми Kaltek, Італія). Зрізи парафінових блоків фрагментів кісткової тканини товщиною 5–10 мкм виготовляли на ротаційному мікротомі, далі забарвлювали гематоксилином Вейгерта та 1 % спиртовим розчином еозину, після чого аналізували під тринокулярним мікроскопом Fusion FS 75–30 фірми



Micromed (Китай) та камерою Microscope digital eyepiece MDS-500 з використанням програми Vividia Able Score. Оцінку гістоморфологічних препаратів проводили за запропонованою нами системою балів (табл. 2.3).

Таблиця 2.2

**Система балів для оцінки зразків губчастої і компактної кістки за макроморфологічного дослідження**

<b>Критерії</b>	<b>Бали</b>	<b>Опис</b>
<b>Візуалізація дефекту:</b>	0	чітко видимий
	2	частково виповнений регенератом
	3	дефект повністю заповнений регенератом
	4	дефект не візуалізується (або тільки за рахунок композитного матеріалу)
<b>Щільність регенерату у місці дефекту</b>	1	не щільний
	2	щільний фіброзно-хрящовий регенерат
	3	щільний, представлений кістковою тканиною
	4	щільний, представлений кістковою тканиною, яка не відрізняється від навколишніх тканин
<b>Контакт регенерату з материнською кісткою</b>	1	відсутній
	2	частковий, не рівномірний
	3	рівномірний, міцний

Гематологічні методи дослідження. Кількість еритроцитів, тромбоцитів і лейкоцитів визначали у периферичній крові загальноприйнятими методами, а гемоглобіну – гемоглобінціанідним.

В сироватці крові визначали вміст NO методом Гріна [261] у модифікації Голікова [262], гаптоглобіну – за реакцією з риванолом наборами ПрАТ «Реагент» (Україна) та  $\alpha_2$ -макроглобуліну – за К.М. Веремеєнком зі співавт.

Таблиця 2.3

**Система балів гістологічної оцінки регенератів губчастої і компактної кістки за мікроскопічного дослідження на 42-гу добу репаративного остеогенезу**

Характеристика регенерату губчастої кістки		Бали	Характеристика регенерату компактної кістки		Бали
Регенерат представлений	Хрящовою тканиною	1	Регенерат представлений	Хрящовою тканиною	1
	Переважаю хрящовою тканиною, меншою мірою кістковою	2		Переважаю хрящовою тканиною, меншою мірою кістковою	2
	Переважаю кістковою з осередками хрящової тканини	3		Переважаю кістковою з осередками хрящової тканини	3
	Кістковою тканиною	4		Кістковою тканиною	4
Осередки ретикулофіброзної кісткової тканини	Значні ділянки	1	Осередки ретикулофіброзної кісткової тканини	Значні ділянки	1
	Невеликі ділянки	2		Невеликі ділянки	2
	Відсутні	3		Відсутні	3
Об'єм трабекул губчастої речовини	Невеликий	1	Кісткова тканина	Об'єм ретикулофіброзної кісткової тканини губчастої структури переважає над компактною речовиною	1

Продовження таблиці 2.3

	Помірний	2		Об'єм компактної речовини кісткової тканини переважає над ретикулофіброзною кістковою тканиною	2
	Значний	3		Початок формування у центральних ділянках кісткового дефекту	1
Товщина трабекул губчастої речовини	Тонкі	1	Остеони	Об'єм несформованих > об'єм сформованих	2
	Помірної товщини	2		Об'єм сформованих > об'єм несформованих	3
	Мають значну товщину	3		Сформовані	4
Щільність розміщення трабекул	Не щільно	1	Розміщення остеонів	Не щільно розміщені	1
	Щільно	2			
Кількість ядер клітин	Невелика	1		Щільно розміщені	2
	Помірна	2			
	Велика	3			

Продовження таблиці 2.3

(остеобластів) на поверхні трабекул					
Кількість ядер клітин (остеоцитів) у товщі трабекул	Невелика	1	Кількість ядер остеоцитів у товщі кісткових пластинок	Невелика	1
	Помірна	2		Помірна	2
	Велика	3		Велика	3
Остеоцити	Незамуровані в остеоцитарні лакуни	1	Остеоцити	Незамуровані в остеоцитарні лакуни	1
	Незамурованих > замурованих	2		Незамурованих > замурованих	2
	Замурованих > незамурованих	3		Замурованих > незамурованих	3
	Замуровані в остеоцитарні лакуни	4		Замуровані в остеоцитарні лакуни	4
Міжбалкові простори	Великого розміру	1	Синтез кісткових пластинок	Нерівномірний	1
	Переважно великого розміру	2			
	Переважно невеликого розміру	3		Рівномірний	2

Продовження таблиці 2.3

	Невеликі	4			
Щільність клітин у міжбалкових просторах	Невелика кількість гемопоетичних клітин	1	Товщина кісткових балок губчастої речовини	Тонкі	1
	Помірна кількість гемопоетичних клітин	2		Помірної товщини	2
	Значна кількість гемопоетичних клітин	3		Мають значну товщину	3
Судинні канали	Невелика кількість	1	Судинні канали	Невелика кількість	1
	Помірна кількість	2		Помірна кількість	2
	Велика кількість	3		Велика кількість	3

[270]. КЛФ визначали за Вагнером В.К. зі співавт. [271]. Принцип методу полягає у розщепленні 4-фенілфосфату з утворенням 4-нітрофенолу та ортофосфату. Рівень активності ТрКФ визначали набором реактивів ТОВ «Лабораторія Гранум» (Україна). Принцип методу полягає у розщепленні альфа-нафтилфосфату на альфа-нафтол+фосфат з використанням як специфічного агента для кісткового ізоферменту кислотої фосфатази тартрату.

Рівень загального кальцію (Ca), неорганічного фосфору (P), загального білка і альбуміну – наборами «Філісіт-Діагностика» (Україна). Вимірювання проводили спектрофотометром Stat Fax 4500.

В плазмі крові визначали рівень РФ шляхом осадження фосфатним буфером [272], активність АТ-III набором ТОВ «Лабораторія Гранум», (Україна), виражену у відсотках до норми.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням MS Excel загально прийнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього арифметичного значення та стандартної похибки середнього значення ( $M \pm m$ ). Достовірними вважали відмінності між групами  $p < 0,05$ .

Результати клінічних, рентгенологічних, макроморфологічних, гістологічних, гематологічних, біохімічних та імунологічних досліджень подано у вигляді фото, рентгенограм, діаграм, таблиць і рисунків.

Дослідження проведено відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Official Journal of the European Union L276/33, 2010), а також у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 28.03.2006 р № 27, ст. 230, наказу МОН № 416/20729 від 16 березня 2012 р. «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» та схвалене Етичним комітетом Білоцерківського НАУ (висновок №2 від 31.05.18 р., протокол № 1).

## РОЗДІЛ 3

### ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЖИМІВ ЦЕНТРИФУГУВАННЯ ЗА ОДЕРЖАННЯ ЗБАГАЧЕНИХ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ ТА ФІБРИНУ

Використовують декілька різновидів тромбоцитарних концентратів – PRP [72, 142] та PRF [73, 74, 273]. Ці аутологічні продукти різняться один від одного за фізичними властивостями і способами їх одержання. На початку ери застосування тромбоцитарних концентратів не надавалося особливого значення технічним параметрам центрифугування, хоча це є ключовим чинником у формуванні співвідношення клітинних елементів у продуктах PRP-технологій.

Центрифугування – це процес, за якого внаслідок взаємодії сил гравітації та тяжіння частинок (клітин) і відцентрової сили відбувається розподіл клітин, у залежності від їх розміру і маси, в певному об'ємі зразка крові [164]. Відомо [82, 214], що від кількості тромбоцитів у PRP залежить ступінь їх впливу на репаративні процеси, а за одержання PRP внаслідок процесу полімеризації відбувається зміщення ділянки концентрування тромбоцитів у зразку крові.

У зв'язку з цим, для встановлення оптимальних режимів центрифугування за одержання тромбоцитарних концентратів, як було зазначено вище (див. розд. 2), цитологічно та гістологічно визначали ділянки концентрування клітин у зразках PRP та PRF за різних величин відносної відцентрової сили центрифугування.

#### **3.1. Цитологічне дослідження плазми і макроморфологія фібринових згустків одержаних за різних режимів центрифугування крові**

За підрахунку кількості тромбоцитів у зразках PRP, одержаних у діапазоні 100–1843 g встановлено наступні результати (табл. 3.1). Зі збільшенням величини відцентрової сили від 100 g і до 1843 g відбувалося прогресуюче осідання тромбоцитів на лейкоцитарний шар з наступною їх

Таблиця 3.1

**Кількість тромбоцитів у плазмі крові після центрифугування за різних величин відносної відцентрової сили**

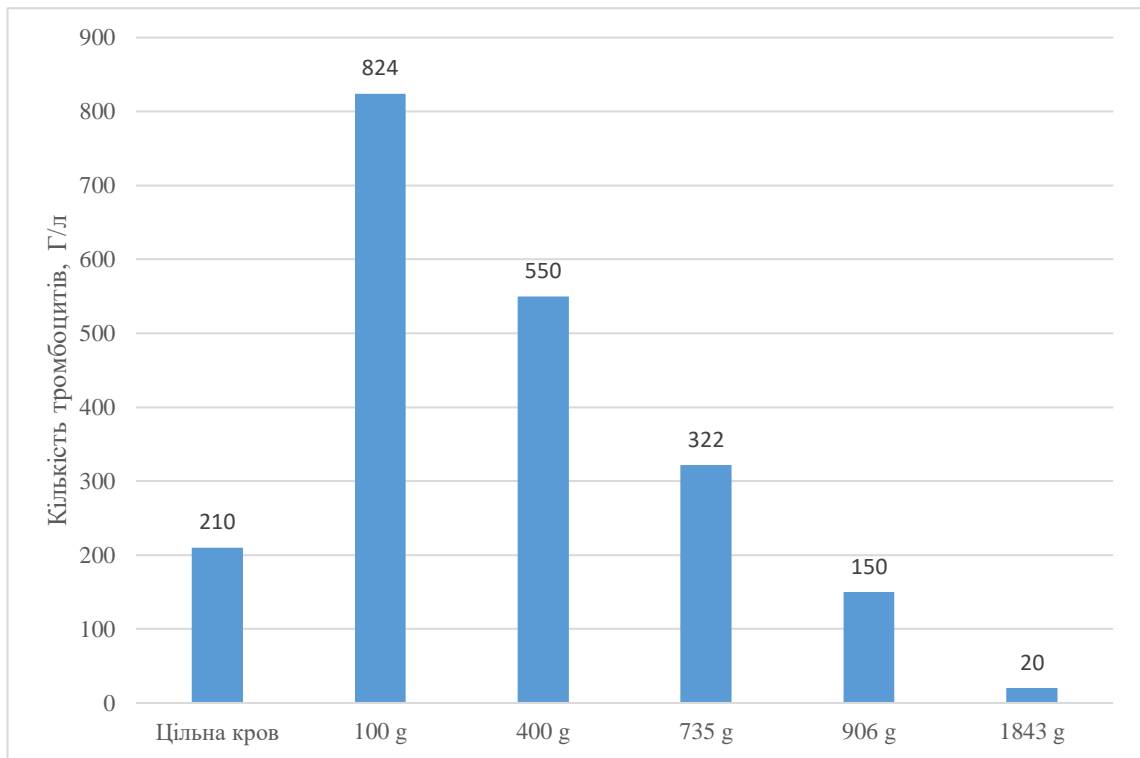
Кількість кролів/зразків крові	Відносна відцентрова сила	Час центрифугування	Середня кількість тромбоцитів у плазмі, Г/л, $M \pm m$
n=5	100 g	3 хв	824±30,4*•
n=5	400 g	10 хв	550±21,2*•
n=5	735 g	10 хв	322±18,8*•
n=5	906 g	10 хв	150±23,5*••
n=5	1843 g	10 хв	20±4,5*•

**Примітка.** Значення p: \* – <0,001, порівняно з вищим параметром центрифугування; • – <0,001, •• – <0,05, порівняно з кількістю тромбоцитів у цільній крові.

адгезією на ньому. Їх кількість була щоразу достовірно нижчою ( $p < 0,001$ ). При цьому лише у випадках центрифугування за 100 g та 400 g одержали концентрації тромбоцитів, які вважаються [77, 189] достатніми для досягнення лікувальних ефектів тромбоцитарних мас. Проте, достовірно найвищою виявилася концентрація тромбоцитів у плазмі за відносної відцентрової сили 100 g – 824±30,4 Г/л. При цьому, порівняно із вмістом тромбоцитів (рис. 3.1) у зразках цільної крові – 210±9,6 Г/л, вона виявилася більшою в 3,9 раза ( $p < 0,001$ ), в 1,5–41,2 раза ( $p < 0,001$ ) (рис. 3.1) порівняно з іншими режимами центрифугування.

Мікроскопія мазків бідної тромбоцитами плазми та зразків плазми крові, одержаних за різних величин відносної відцентрової сили, засвідчила нерівномірний розподіл за кількістю тромбоцитів у різних полях зору (рис. 3.2). У бідній тромбоцитами плазмі візуалізувалися рідко розміщені в полі зору тромбоцити, забарвлені у фіолетовий колір. За використання 100 g їх кількість у мазках була значно більшою, подекуди візуалізувалися їх скупчення. Найбільшу щільність клітин виявили за умов центрифугування





**Рис. 3.1. Концентрація тромбоцитів у цільній крові кролів та у плазмі крові за різних режимів центрифугування**

крові відцентровою силою у 400 g, а за її подальшого збільшення – щільність клітин у зразках плазми, навпаки, починала зменшуватися, особливо у випадку 1843 g.

Також за різних величин відцентрової сили центрифугування встановлено очевидні відмінності у формуванні згустків PRF. З підвищенням цього параметра щоразу збільшувався і об'єм утвореного PRF. Так, після приготування I-PRF, для якого застосовували меншу величину відносної відцентрової сили, візуально його об'єм значно менший, порівняно зі стандартним PRF, а межа з еритроцитами – менш чітка (рис. 3.3).

Шляхом лінійного вимірювання за допомогою PRF та I-PRF було встановлено, що збільшення відцентрової сили центрифугування забезпечує формування згустку з достовірно більшою довжиною (табл. 3.2, рис 3.4). Тобто збільшення величини g за центрифугування крові прямо пропорційно зумовлює більшу довжину фібринового згустку, але обернено пропорційно – зменшення кількості в ньому тромбоцитів.

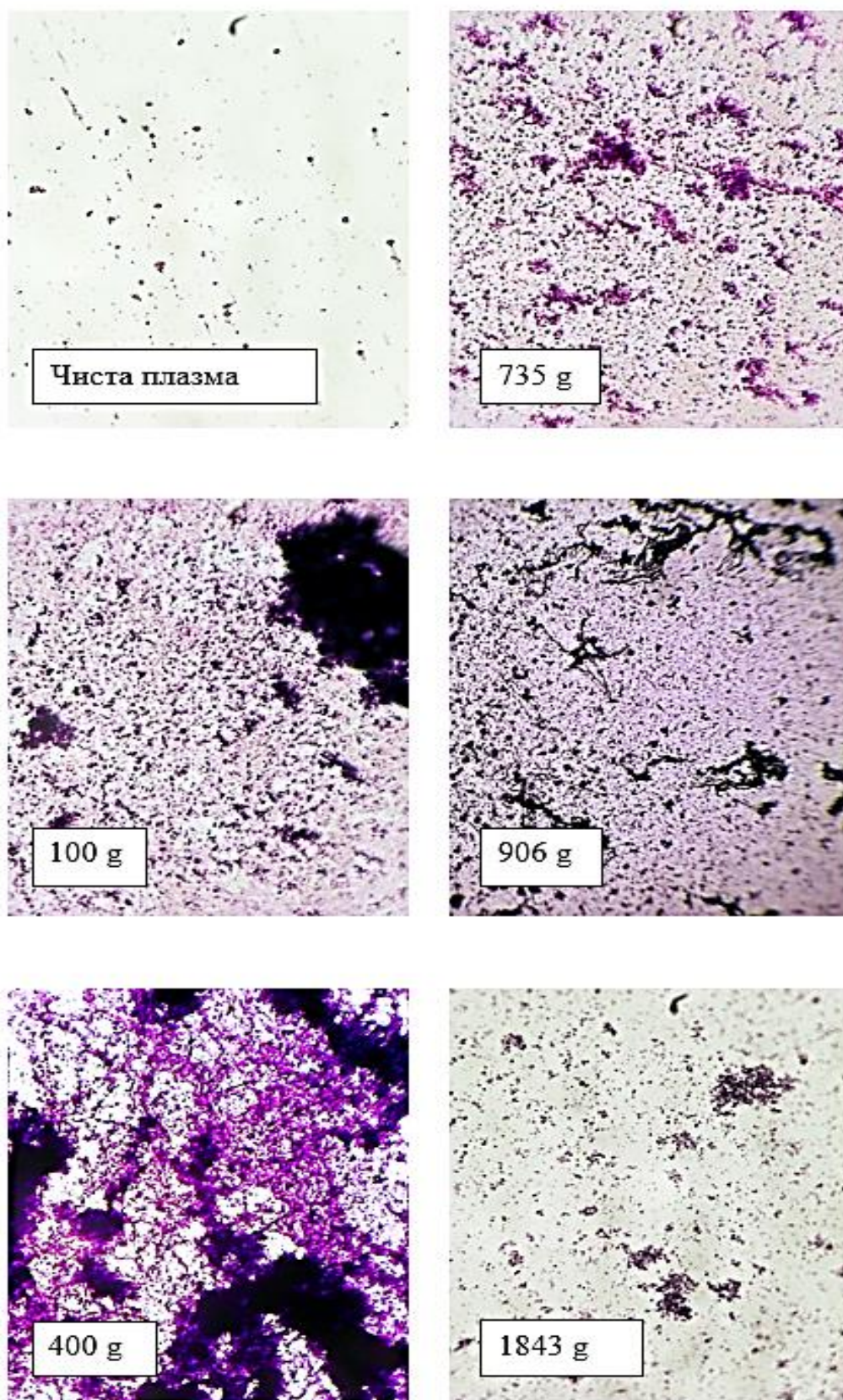


Рис. 3.2. Гістологічна картина мазків чистої плазми та її зразків, одержаних за різних режимів центрифугування (Leicodif 200,  $\times 1000$ )

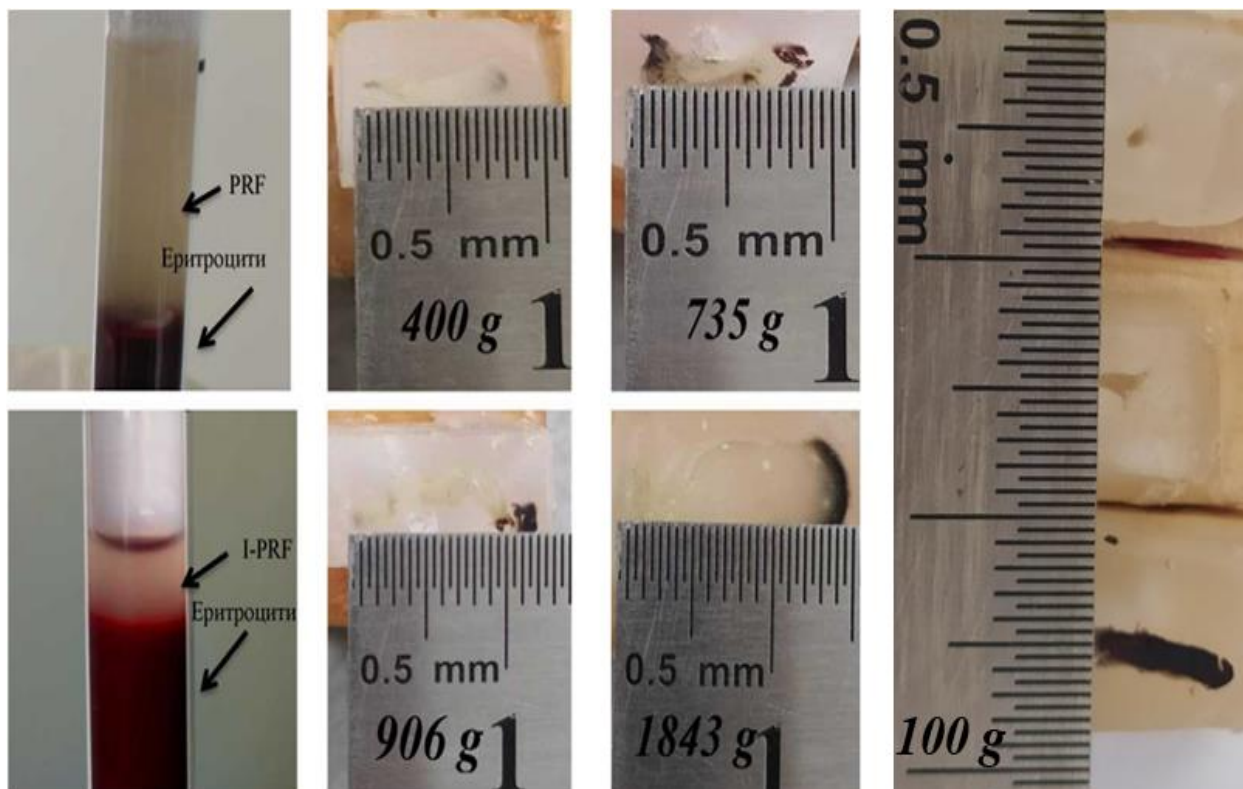


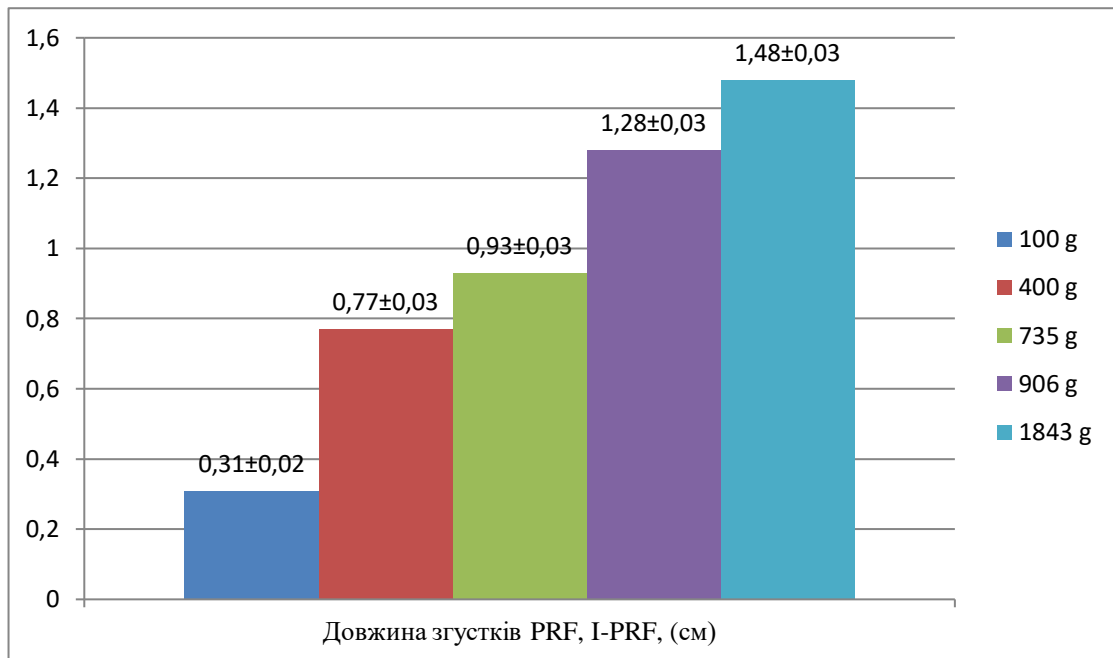
Рис. 3.3. Об'єми та лінійні розміри PRF та I-PRF

Таблиця 3.2

Довжина (см) згустків PRF та I-PRF за різних величин відносної відцентрової сили центрифугування

№ п/п	Величини відносної відцентрової сили				
	100 g	400 g	735 g	906 g	1843 g
1	0,3	0,8	0,9	1,2	1,45
2	0,25	0,75	0,85	1,3	1,5
3	0,34	0,7	0,95	1,35	1,4
4	0,28	0,75	0,95	1,25	1,5
5	0,39	0,85	1,0	1,3	1,55
<b>M±m</b>	<b>0,31±0,02</b>	<b>0,77±0,03**</b>	<b>0,93±0,03*</b>	<b>1,28±0,03**</b>	<b>1,48±0,03*</b>

Примітка. Значення p: \* – <0,01, \*\* – <0,001, порівняно з показником попередньої величини g.



**Рис. 3.4. Залежність довжини згустків PRF та I-PRF від величини відцентрової сили центрифугування зразків крові**

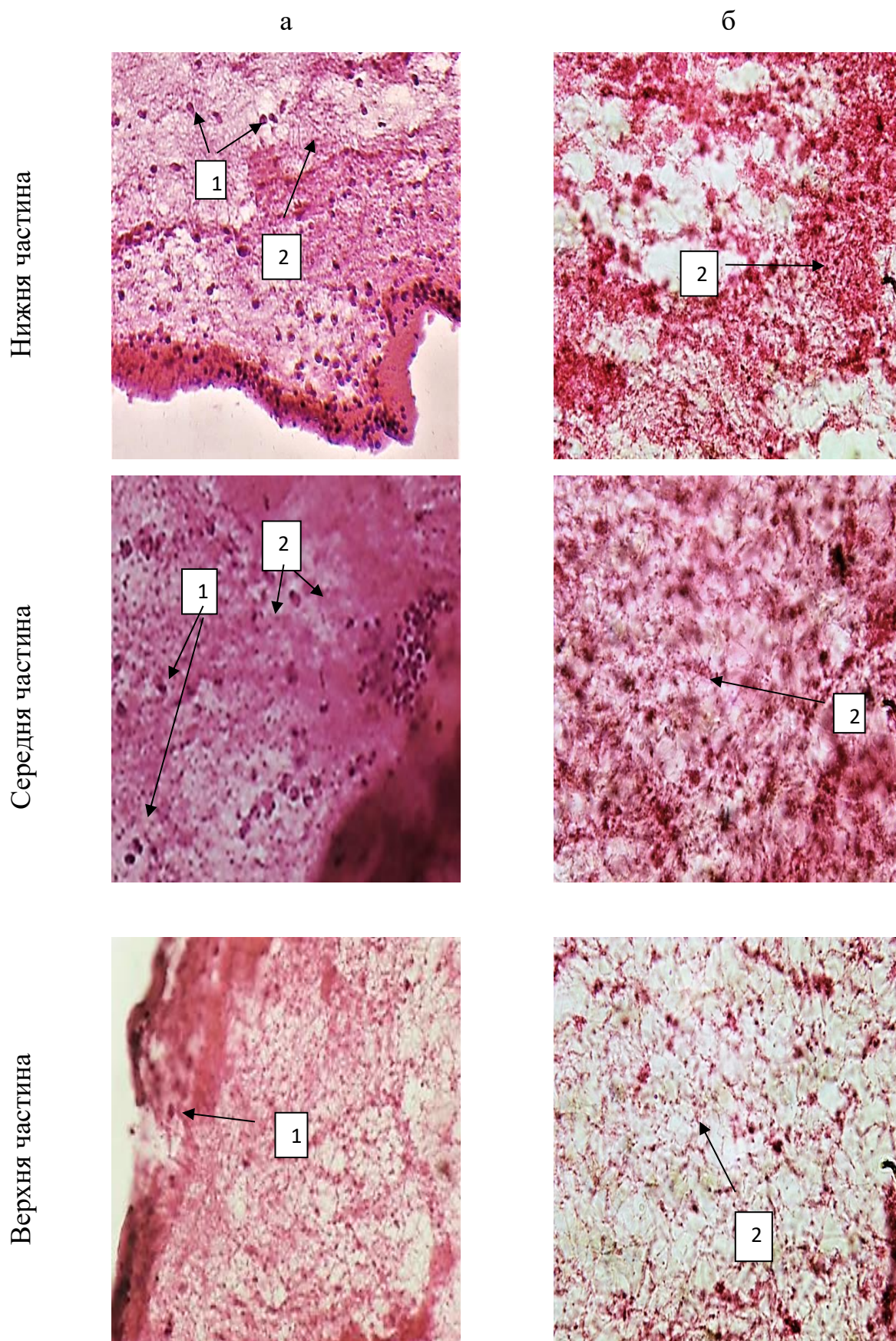
### **3.2. Гістоморфологічна характеристика PRF, одержаного за різних величин відцентрової сили центрифугування крові**

Гістологічне дослідження сформованих згустків PRF за різних режимів центрифугування дало змогу виявити ділянки концентрування в них тромбоцитів.

Зокрема, встановлено (рис. 3.5), що центрифугування крові за 400 g, зумовлює, головним чином, концентрування лейкоцитів у нижній частині згустку PRF, тоді як тромбоцити розміщені в усіх ділянках практично рівномірно.

Водночас за центрифугування зразка крові при 735 g (рис. 3.6) переважна більшість лейкоцитів та еритроцитів розміщується в нижній частині згустку, в невеликій кількості лейкоцити знаходяться в центральній, а у верхній частині – лише тромбоцити. Біля стінок пробірки у верхній її частині спостерігали незначну кількість еритроцитів.

Після центрифугування зразка крові за 906 g (рис. 3.7) встановлено розміщення еритроцитів та лейкоцитів лише у нижній частині за однозначно



**Рис. 3.5. Гістоструктура нижньої, середньої та верхньої частин фібринових згустків за 400 г: 1 – лейкоцити, 2 – тромбоцити. Гематоксилін-еозин, а  $\times 400$ ; б  $\times 1000$**

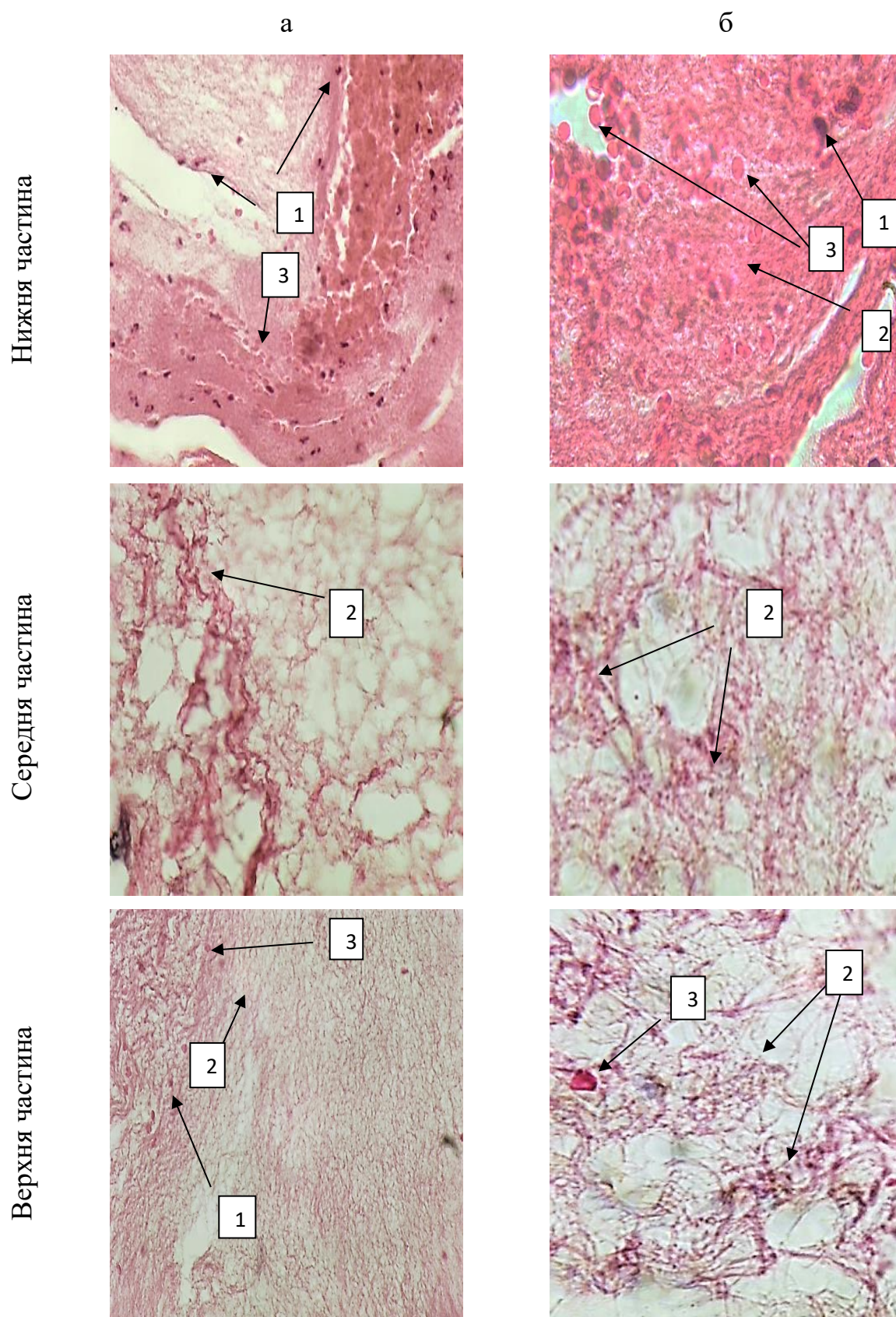


Рис. 3.6. Гістоструктура нижньої, середньої та верхньої частин фібринових згустків за 735 g: 1 – лейкоцити, 2 – тромбоцити, 3 – еритроцити. Гематоксилін-еозин, а  $\times 400$ ; б  $\times 1000$

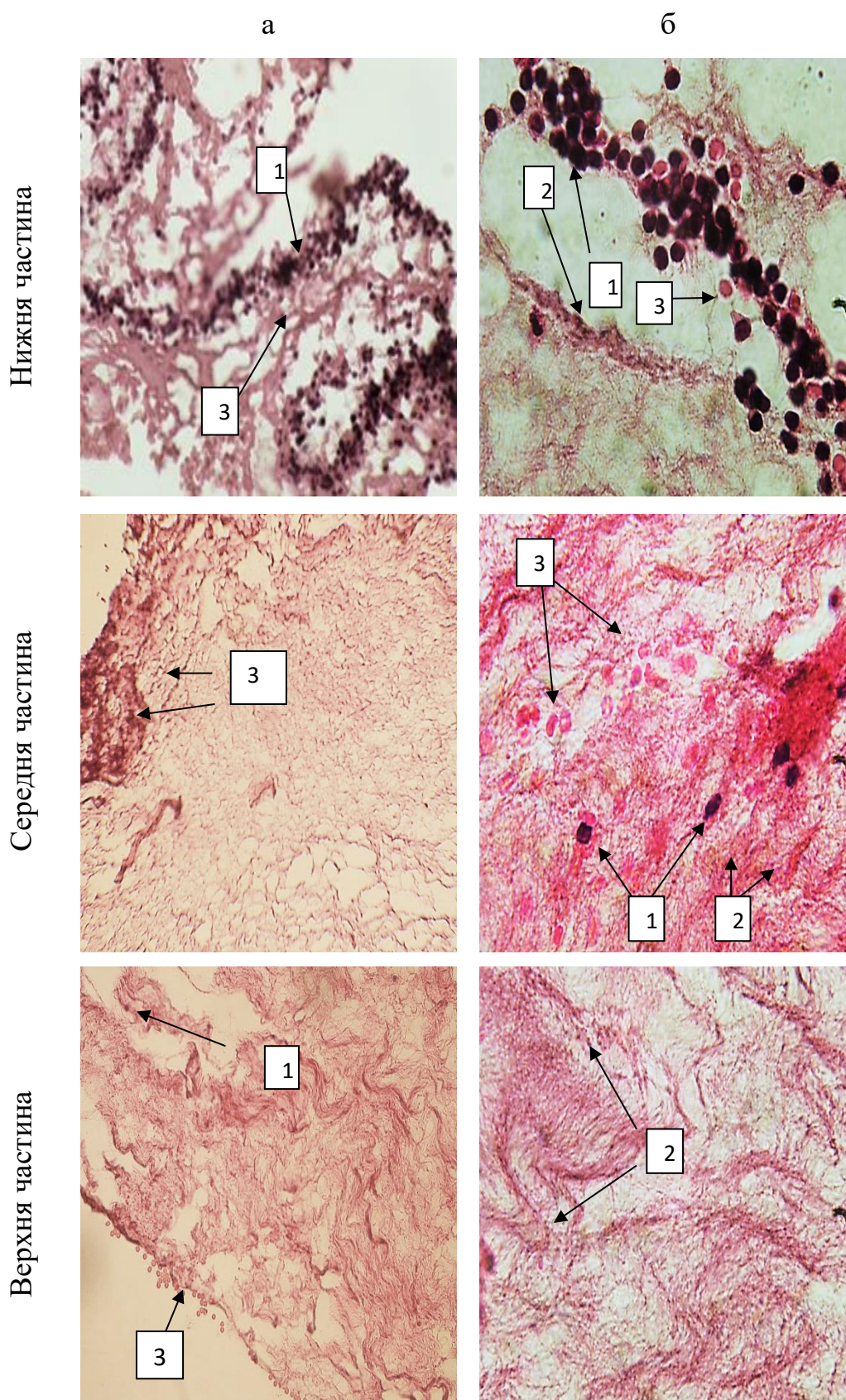


Рис. 3.7. Гістоструктура нижньої, середньої та верхньої частин фібринових згустків за 906 g: 1 – лейкоцити, 2 – тромбоцити, 3 – еритроцити. Гематоксилін-еозин, а  $\times 400$ ; б  $\times 1000$

значної кількості тромбоцитів у вигляді скупчень, а у центральній та верхній частинах згустку були скупчення переважно тромбоцитів із поодинокими еритроцитами, але тільки на периферії, біля стінок пробірки.

Після центрифугування зразка крові з параметрами відцентрової сили 1843 g (рис. 3.8) у нижній частині згустку виявлено у невеликій кількості еритроцити та лейкоцити, але переважна більшість останніх зосередилася поза його межами, а саме у еритроцитарному шарі. При цьому значна кількість тромбоцитів розміщувалася майже на межі з основною масою еритроцитів. У центральній та верхній частинах згустку знаходилася невелика кількість тромбоцитів у вигляді скупчень, розташованих на периферії згустку. Тобто за таких умов центрифугування основна маса тромбоцитів знаходиться поза межами фібринового згустку, який відповідно не набуває біологічних властивостей притаманних тромбоцитам.

За центрифугування з відносною відцентровою силою 100 g (рис. 3.9) у нижньому шарі I-PRF (червонуватого кольору) відмічали велику кількість еритроцитів, лейкоцити, які були присутні майже у всіх ділянках, а основна маса тромбоцитів у вигляді фіолетових скупчень розміщена у середньому та верхньому шарах.

Таким чином, представлене дослідження демонструє, що різні величини відносної відцентрової сили центрифугування крові та його часу суттєво впливають на розподіл клітинних елементів у згустках фібрину. При збільшенні параметрів відносної відцентрової сили суттєво подовжується довжина фібринового згустку та змінюється в ньому концентрація тромбоцитів, що схематично зображено на рис. 3.10. Зі збільшенням параметрів центрифугування ділянки концентрування тромбоцитів зміщуються в бік еритроцитарної маси. Поступове зменшення кількості тромбоцитів у зразках PRP, одержаних за щоразу вищих значень відцентрової сили, зумовлене їх осіданням у нижні шари плазми на лейкоцитарну плівку. Відповідно у досліджуваному об'ємі PRP концентрація тромбоцитів щоразу суттєво знижується, що підтверджується цитологічним дослідженням мазків



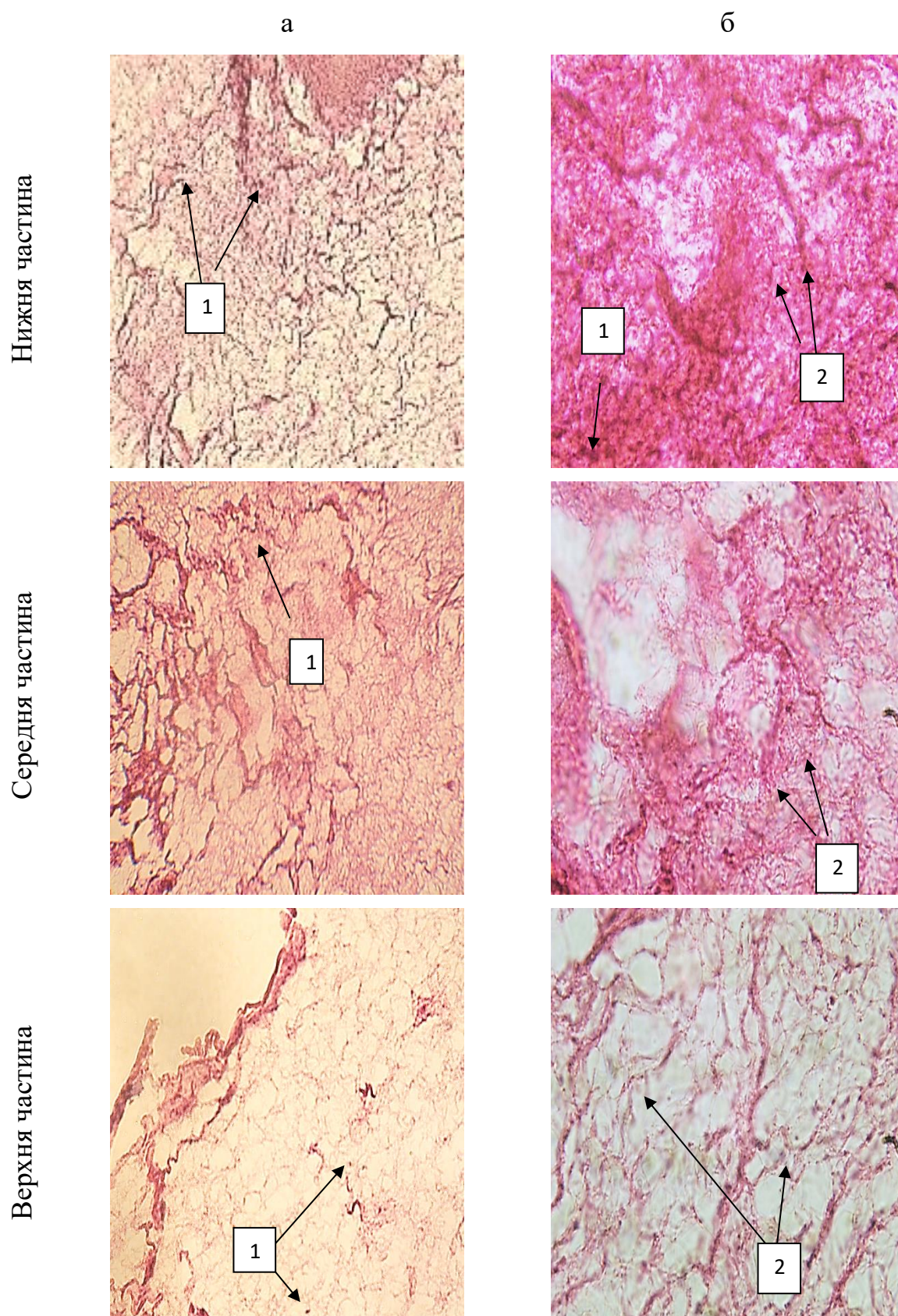


Рис. 3.8. Гістоструктура нижньої, середньої та верхньої частин  
**фібринових згустків за 1843 г: 1 – лейкоцити,**  
**2 – тромбоцити. Гематоксилін-еозин, а  $\times 400$ ; б  $\times 1000$**

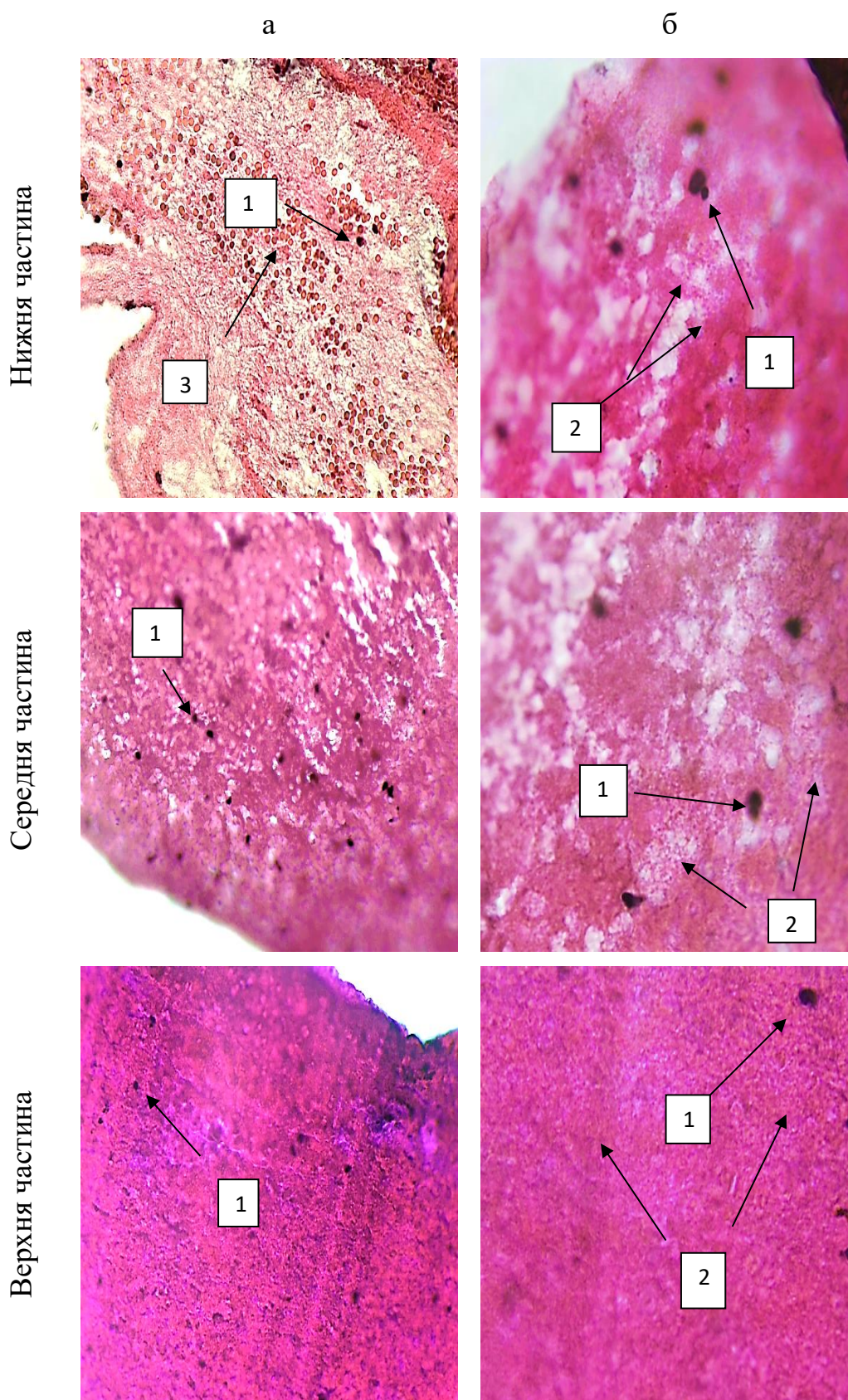
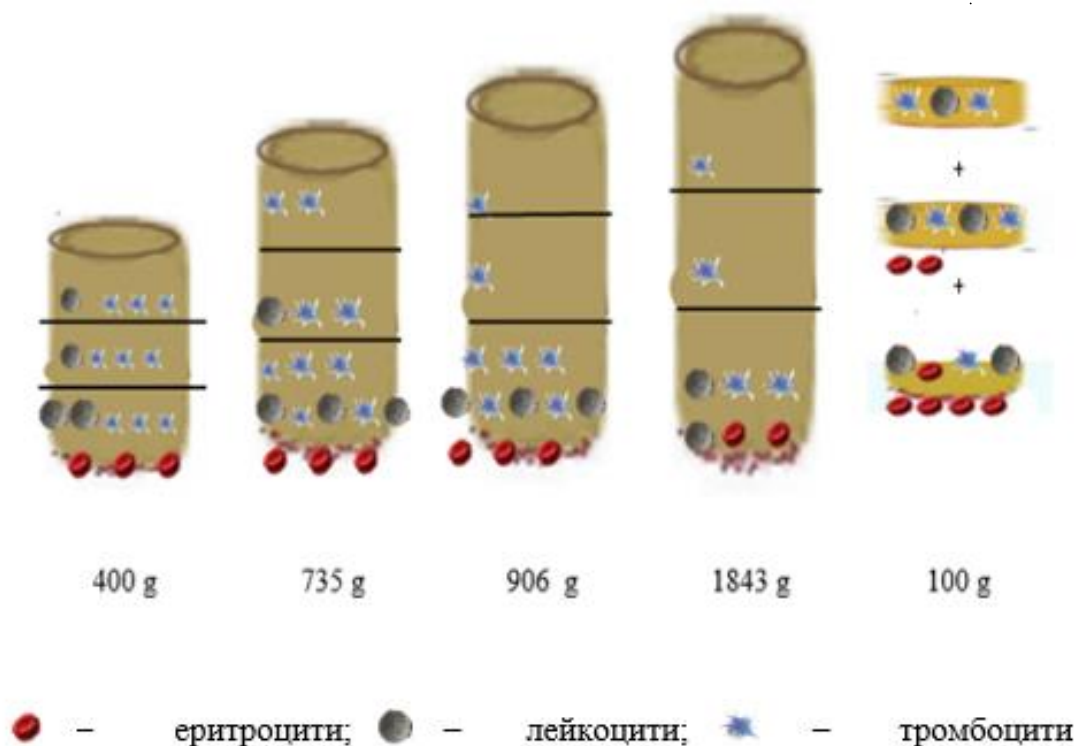


Рис. 3.9. Гістоструктура нижньої, середньої та верхньої частин фібринових згустків за 100 г: 1 – лейкоцити, 2 – тромбоцити, 3 – еритроцити. Гематоксилін-еозин, а  $\times 400$ ; б  $\times 1000$



**Рис. 3.10. Схема згустків PRF, одержаних за різних режимів центрифугування, з ділянками концентрування клітин**

плазми крові.

Дослідження зарубіжних вчених [259], які проводили визначення кількості клітин у згустках PRF (перешкоджаючи їх згортанню) за різних режимів центрифугування та визначення концентрації судинно-ендотеліального фактора росту показали, що зі зниженням відносної відцентрової сили відбувається підвищення рівня лейкоцитів і концентрації судинного ендотеліального фактора росту (VEGF). Проте вони не верифікують ділянок розподілу клітин у згустках.

Представлене дослідження демонструє, що найбільш оптимальною величиною відносної відцентрової сили для отримання тромбоцитарної маси у плазмі крові є 100 g, за якої можливо досягти кількості тромбоцитів більшої за 800 Г/л. У випадку центрифугування протягом 3 хв одержується рідка форма фібрину, збагачена тромбоцитами, яка розширює можливості його застосування, зокрема шляхом ін'єкційного введення у ділянку перелому чи будь-якої іншої травми.

PRF є сіткою фібринових волокон, серед яких у залежності від величини відцентрової сили у різних його ділянках розташовуються еритроцити, лейкоцити та тромбоцити у вигляді скупчень. Зважаючи на те, що I-PRF знаходиться у рідкій формі, все ж через деякий час відбувається процес його полімеризації і перетворення у щільний згусток, схожий за зовнішнім виглядом на PRF, хоч і менший за об'ємом. За результатами аналізу гістологічних зразків згустків фібрину саме у цій формі було виявлено ділянки найбільшої концентрації лейкоцитів та тромбоцитів, які майже рівномірно розподілилися в різних шарах біоматеріалу.

Поряд з цим представлені результати дають розуміння того, що застосування PRP, різних ділянок згустків PRF або невеликої кількості I-PRF різною мірою будуть впливати на репаративні процеси, оскільки вони різняться концентрацією лейкоцитів та тромбоцитів, їх локалізацією у ділянках згустків і, відповідно, за вмістом у них лейкоцитарних чи тромбоцитарних факторів росту. Припускають [274], що величина відносної відцентрової сили також здатна впливати на вихід біоактивних речовин з альфа-гранул тромбоцитів. Проте слід врахувати, що лейкоцити, які потрапляють у I-PRF теж є джерелом VEGF та інших факторів росту [88], а нейтрофіли забезпечують випуск протеаз та інших речовин, спрямованих на боротьбу з шкідливими мікроорганізмами. Не виключено, що їх потрапляння у тканини у великій концентрації з частиною згустку фібрину, збагаченого тромбоцитами, може викликати додаткові реакції у тканинах.

В зв'язку з цим наступний етап роботи полягав у дослідженні впливу різних форм тромбоцитарних концентратів: (PRP, i-PRF, PRF), одержаних за оптимізованих режимів центрифугування крові, з урахуванням ділянок концентрування тромбоцитів у фібринових згустках.

## РОЗДІЛ 4

### КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВПЛИВУ PRP І РІЗНИХ ТИПІВ PRF ТА ЇХ КОМПОЗИЦІЇ З КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНОЮ КЕРАМІКОЮ НА РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ У КРОЛІВ

Переломи кісток супроводжуються порушеннями локальної гемоциркуляції, які лімітують репаративний потенціал кісткової тканини. Це, в свою чергу, сприяє збільшенню об'єму деструктивних змін, розвитку інфекційно-запальних та імунопатологічних процесів у травмованих тканинах, ступінь яких залежить від складності травми і впливає на тип консолідації переломів та динаміку перебігу її стадій [1, 91, 221]. У зв'язку з цим посттравматична остеорегенерація, особливо у випадках значних дефектів кісткової тканини та за наявності кісткових уламків, залишається суттєвою проблемою і потребує комплексного забезпечення остеокондуктивних та остеоіндуктивних механізмів репаративного остеогенезу [39, 103]. Для оптимізації остеорепаративного процесу розробляються різноманітні органічні та неорганічні матеріали з остеоіндуктивними та остеокондуктивними властивостями [110, 275]. Останнім часом набуває поширення розвиток PRP- та PRF- технологій, що однак потребує всебічного клініко-експериментального обґрунтування.

#### 4.1. Динаміка клініко-рентгенологічних змін

Як було зазначено вище (розділ 2), вплив PRP та PRF на перебіг репаративного остеогенезу в кролів досліджували за модельних кісткових переломів у двох речовинах пластинчастої кісткової тканини: губчастій – гребінь великогомілкової кістки з медіального боку; компактній – середина діяфізу променевої кістки на дорсо-латеральній поверхні передпліччя. При цьому в контрольній групі кролів (n=12) дефекти кісткової тканини залишали загоюватись під кров'яним згустком, а у дослідних групах (n=12 у кожній) їх заповнювали наступними матеріалами: у 1-й – PRP; 2-й – PRF; 3-й – i-PRF; 4-й – ксенологічний PRF; 5-й – PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700.

Клінічно через добу після моделювання дірчастих переломів, відмічали

незначний набряк тканин та помірне підвищення місцевої температури. Функції кінцівок не були порушені. З рани виділявся серозний ексудат у невеликій кількості, який, підсихаючи, утворював кірочку. На 7-му добу набряк та болючість були відсутні у тварин усіх груп, краї рани шкіри були щільно з'єднані з ознаками епітелізації. У цей період проводили зняття швів. Тобто в усіх випадках рановий процес м'яких тканин перебігав без ускладнень.

Водночас стан кісткової тканини в місцях кісткових дефектів мав певні відмінності в групах. Зокрема, починаючи з 8–9-ї доби, у тварин контрольної групи та 3-ї дослідної (i-PRF) пальпаторно у місцях дефектів обох типів кісткової тканини відчувалось невелике і неболюче ущільнення. Воно продовжувало збільшуватися у цих групах аж до 21-ї доби. Разом з тим, у 1-й (PRP) дослідній групі подібну картину відмічали лише у променевих кістках, починаючи з 21-ї доби тривалістю до 42-ї. В інших дослідних групах – 2-й (PRF), 4-й (ксенологічний PRF) та 5-й (PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700) подібних змін не зареєстровано. На 42-гу добу невеликі ущільнення тканин спостерігали лише у компактній тканині 1-ї дослідної групи та губчастій контрольної та 3-ї дослідної груп.

Отже, у випадку загоєння кісткового дефекту під кров'яним згустком виникає формування регенерату досить великого за об'ємом у порівнянні із імплантацією в них тромбоцитарних концентратів. При цьому за використання PRP та i-PRF відбувалося дещо надмірне формування новоутвореної тканини, яка виходила за межі кісткової травми, як і у контрольній групі.

Рентгенологічна картина загоєння кісткових дефектів також мала певні відмінності в групах, а разом з тим, що природно, і в залежності від типу кісткової тканини. Зокрема, на 14-ту добу в контрольній групі (рис. 4.1, а) рентгенологічно краї дефектів були досить чіткими, майже по всій довжині променевої кістки мали місце явища плямистого остеопорозу, як ознака остеорезорбції, пері- та ендостальна реакції поширювалися на значну відстань від дефекту і частково на ліктьові кістки. В 1-й дослідній групі (рис. 4.1, б) періостальна реакція виявилася помірною з ущільненням пері- та

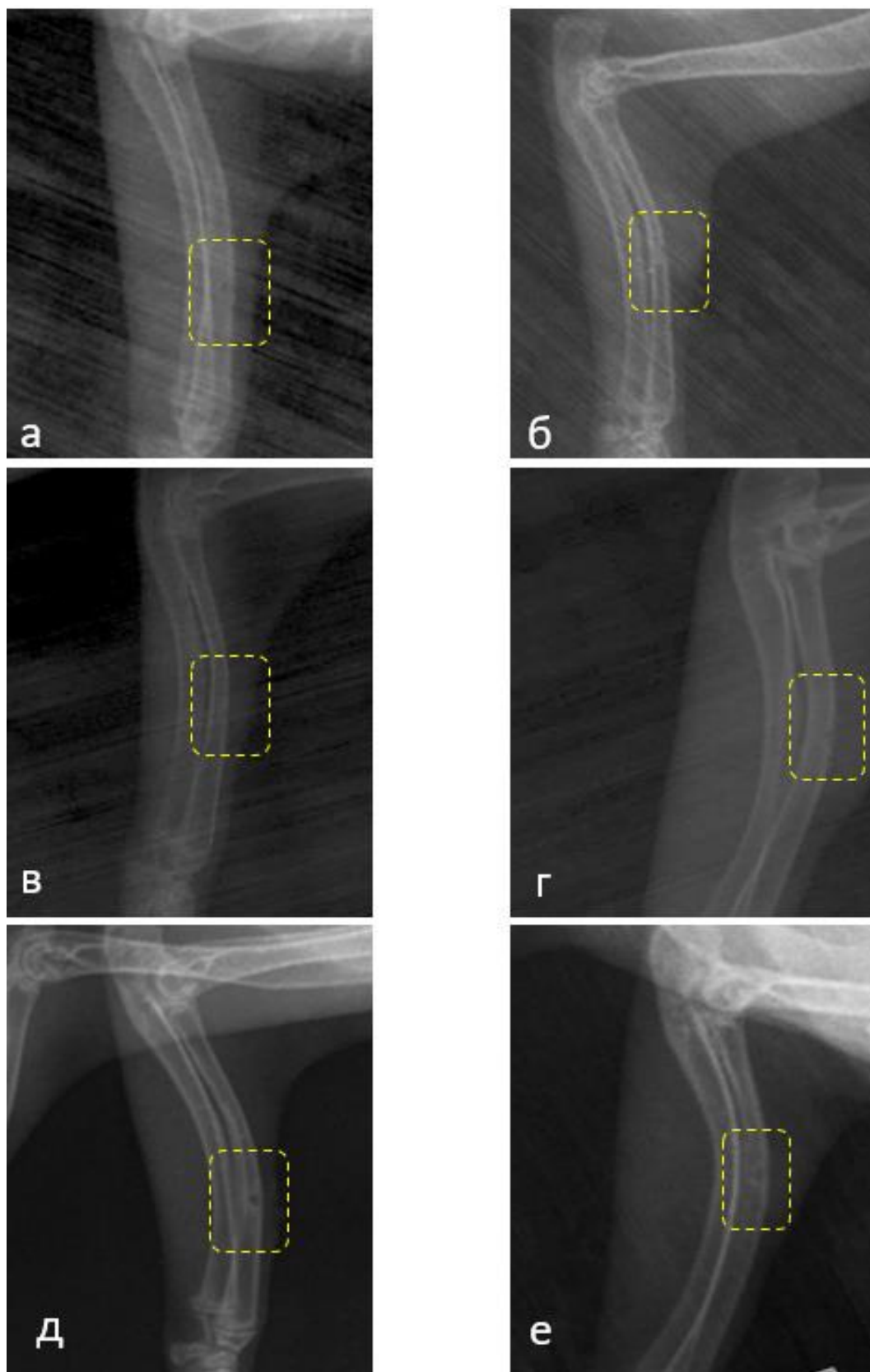


Рис. 4.1. Рентгенограми діафізів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) дослідні групи

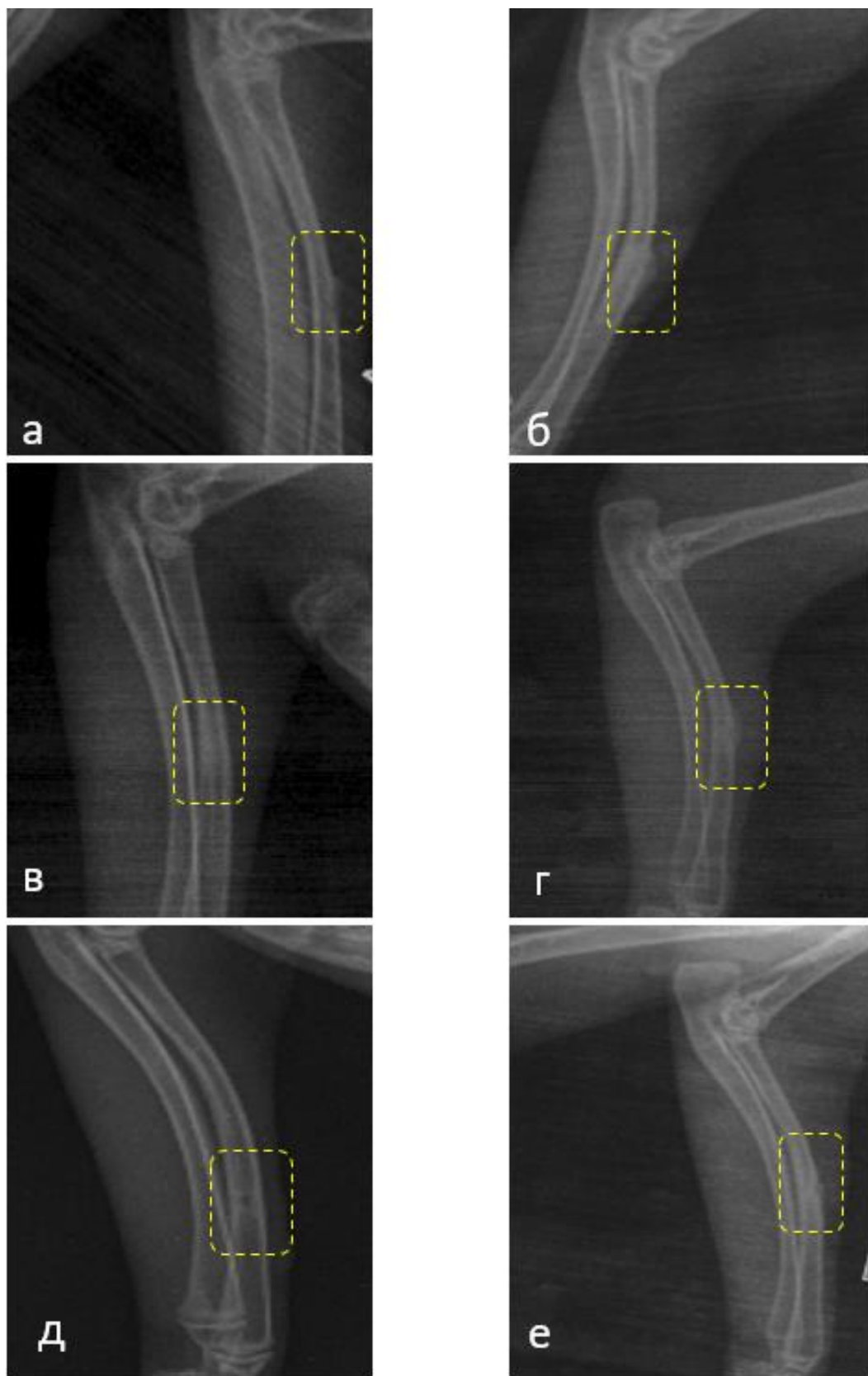
ендоосту в ділянці дефекту, який був майже виповненим остеоїдом. У випадку 2-ї дослідної групи (рис. 4.1, в), в якій у кісткові дефекти вносили PRF, на рентгенограмах періостальна реакція була досить обмеженою, а по поперечних лініях їх периметру формувалися рентгеноущільнені смужки, як свідчення інтенсивного остеогенезу. У 3-й дослідній групі (рис. 4.1, г), в якій імплантували і-PRF, дефект був теж не чітким, майже виповненим пухким остеоїдом з добре вираженими періостальною та ендоостальною реакціями вище і нижче місця кісткової травми. Проте, в 4-й групі (рис. 4.1, д) з ксеногенним PRF місце дефекту чітко окреслювалося ущільненням кісткової тканини з потужною періостальною реакцією, навіть на дотичній поверхні ліктьової кістки, що в цілому відображало надзвичайно інтенсивний та подовжений у часі перебіг запально-резорбтивної стадії репаративного остеогенезу. На рентгенограмах (рис. 4.1, е) 5-ї дослідної групи після композитного остеозаміщення PRF та кальцій-фосфатною керамікою відмічали не чіткі краї кісткових дефектів і неоднорідної щільності регенерат. Пері- та ендоостальні реакції були помірними, у межах кісткового дефекту.

Рентгенологічна картина загоєння кісткових дефектів на 21-шу добу динамічно змінювалася у всіх групах. Так, на рентгенограмах променевих кісток кролів контрольної групи (рис. 4.2, а) залишалися потужними пері- та ендоостальні реакції з їх поширенням на ліктьову кістку та формуванням невеликого хмароподібного остеоїда, який у 1-й дослідній групі був потужним та з більшою рентгенощільністю, що виходила за межі кісткової травми.

Натомість у 2-й дослідній групі кістковий дефект не візуалізувався, а на його місці були розширені, з підвищеною рентгенощільністю, ендо- і периост. Поряд з цим у 3-й дослідній групі (рис. 4.2, г) на місці кісткового дефекту вирізнялося досить окреслене, з помірною рентгенощільністю, остеоїдне поле з ледь помітною обмеженою періостальною реакцією.

За використання ксенологічного PRF (рис. 4.2, д) інтенсивність періостальної реакції виявилася дещо меншою з рентгеноущільненими ділянками, між якими візуалізувалося чітко окреслене рентгенонегативне місце кісткового дефекту. Водночас, у 5-й дослідній групі (рис. 4.2, е), місце





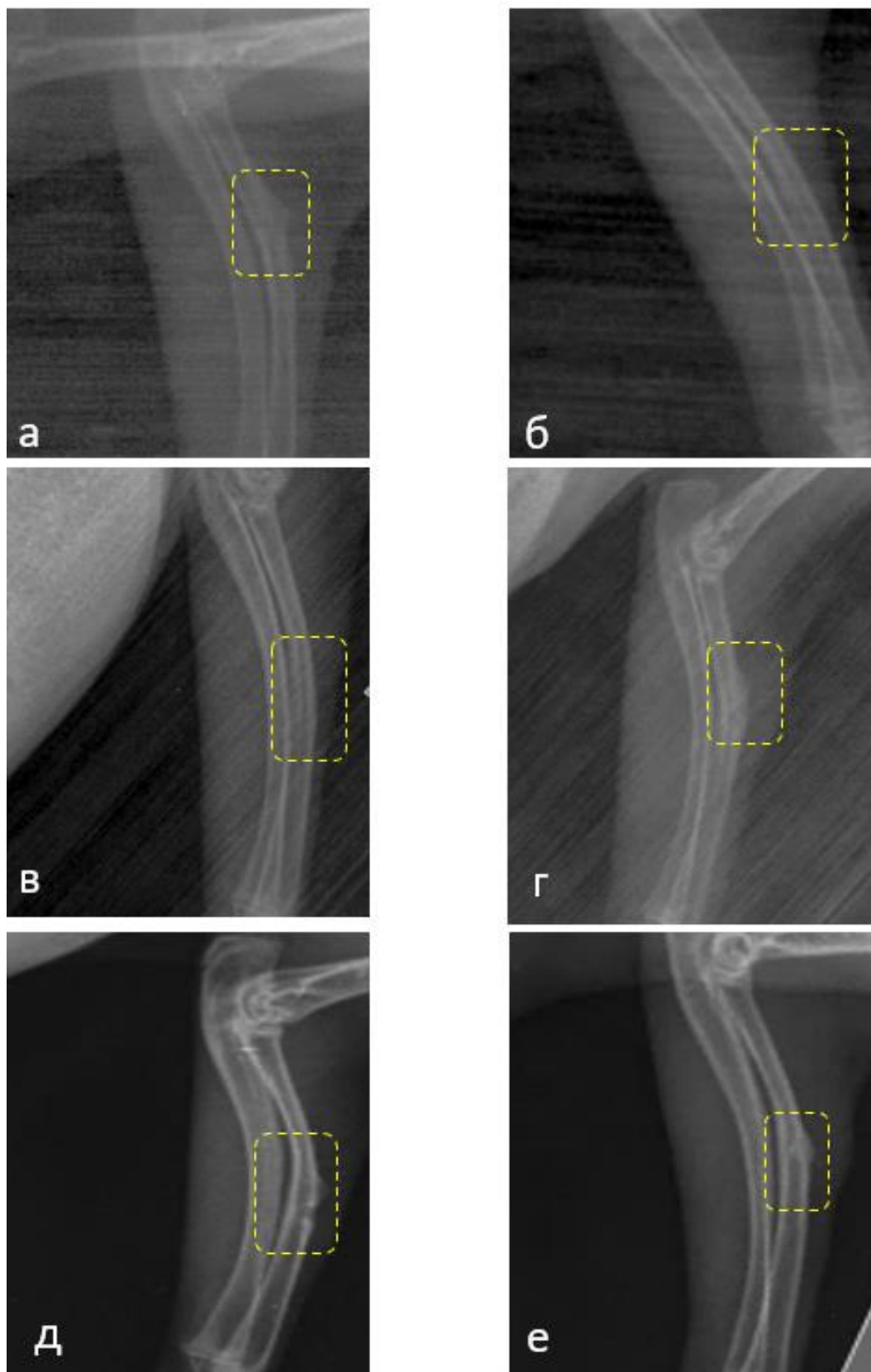
**Рис. 4.2. Рентгенограми діяфізів променевиx кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (і-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+НА/β-ТСР–700) дослідні групи**

кісткового дефекту мало суцільну, чітко виражену підвищену рентгенощільність, особливо з боку ендоостальних ділянок і незначною, точковою періостальною реакцією.

Отже, за рентгенологічною картиною на 21-у добу репаративного остеогенезу у випадку контрольної групи явища запально-резорбтивного характеру супроводжувалися помірним остеогенезом, який виявився більш інтенсивним за використання PRP (1-а дослідна група). У 2-й (PRF) і 3-й (i-PRF) дослідних групах він виявився ще більш динамічним за рахунок як ендоосту, так і періосту, а в 5-й (PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700) – тільки ендоосту, без істотних явищ запального характеру, тоді як за використання ксеногенного PRP (4-а дослідна група) процеси остеогенезу виявилися загальмованими.

Специфічною для кожної групи виявилася рентгенологічна картина загоєння кісткових дефектів і на 42-гу добу репаративного остеогенезу. При цьому в контрольній групі (рис. 4.3, а) ледь помітною залишилася лінія дефекту з неоднорідною рентгенощільністю остеоїда, з розширенням, на досить великому відрізку діяфіза, пери- та ендоосту, а піднімання остеоїду над периостом свідчило про його переважну роль у загоєнні кісткового дефекту. В той же час у 1-й дослідній групі (рис. 4.3, б) місце дефекту вже не візуалізувалося, дещо були потовщені ендо- і періост з помірною періостальною реакцією та явищами плямистого остеопорозу по всій довжині променевої кістки, що свідчило про надлишковий характер процесів ремоделювання кісткової тканини.

В 2-й дослідній групі подібні рентгенологічні ознаки були більш помірні і лише в ділянці кісткової травми. Поряд з цим у 3-й дослідній групі (рис. 4.3, г), в якій у кістковий дефект вносили i-PRF, у цей період чітко прослідковувався неоднорідний хмароподібний остеоїд, що дещо виходив за межі кістки і поширювався проксимальніше і дистальніше від місця кісткової травми, що, швидше за все, свідчило про наявність залишків хрящового регенерату. Однак у 4-й групі (рис. 4.3, д) ще візуалізувалися залишки модельованого дефекту, його краї мали локально підвищену рентгенологічну щільність, яка також поширювалася по всій довжині періосту променевої

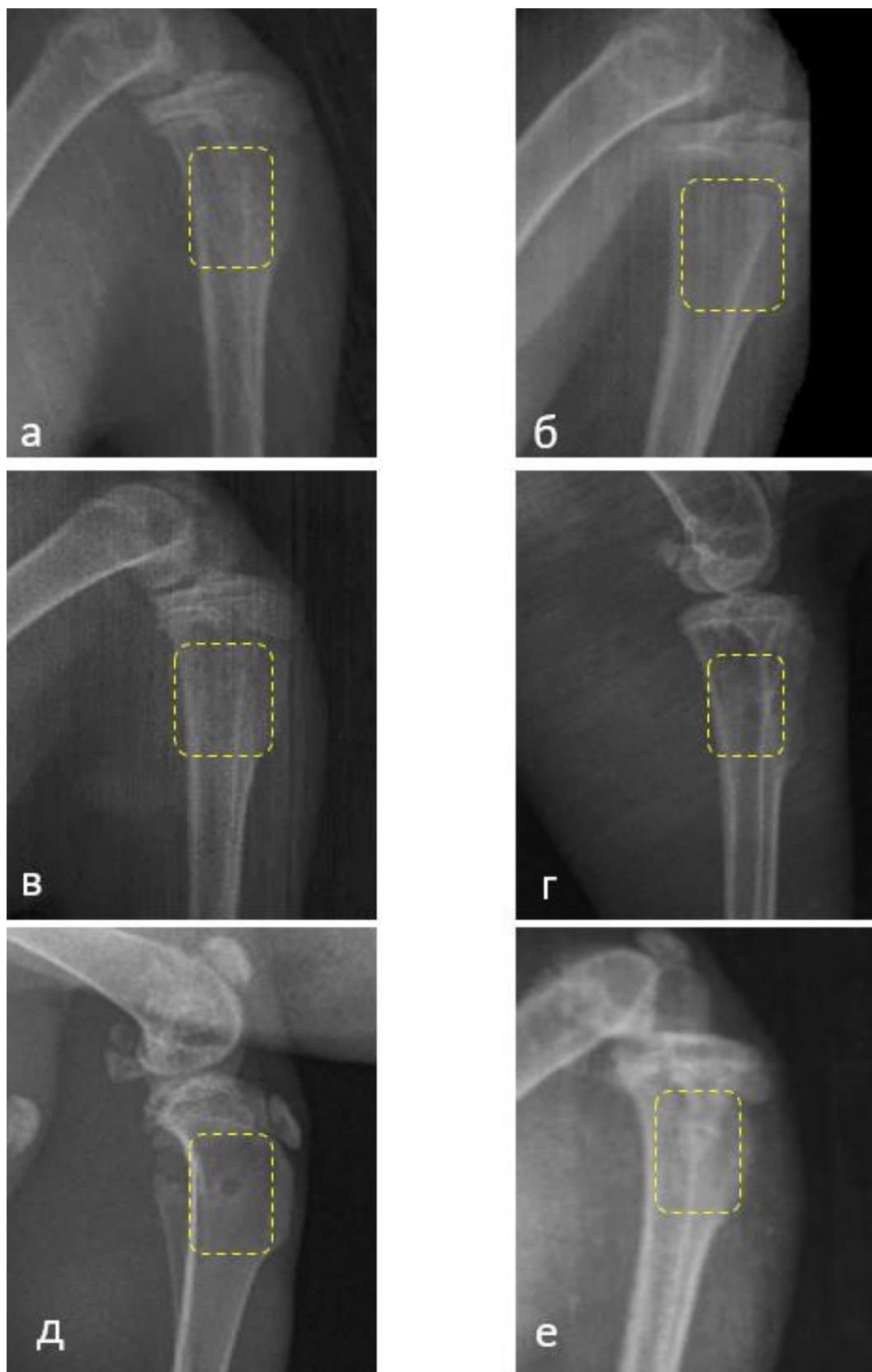


**Рис. 4.3. Рентгенограми діяфізів променевих кісток кролів на 42-у добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/β-TCP-700) дослідні групи**

кістки, а весь діяфіз ліктьової кістки був розширений з явищами формування остеїду. Натомість у 5-й дослідній групі (рис. 4.3, е) реєстрували лише залишки остеїдно-композитного формування з деяким рентгеноуцільненням периосту, що у цілому свідчило про найбільш динамічний перебіг репаративного остеогенезу.

Рентгенологічна картина репаративного остеогенезу в губчастій речовині кісткової тканини великогомілкової кістки мала певні особливості. Зокрема, на 14-ту добу в контрольній групі (рис. 4.4, а) слабо візуалізувалося місце дефекту, структура кісткової тканини виявилася нечіткою із зменшенням її рентгенщільності та формуванням периостальної реакції, що свідчило про інтенсивний перебіг запально-резорбтивної фази репаративного остеогенезу. В 1-й дослідній групі (рис. 4.4, б) ці явища були менш виражені, тоді як у 2-й (рис. 4.4, в) осередки розрідження кістки чергувалися з ділянками її ущільнення. Натомість у 3-й дослідній групі (рис. 4.4, г) ділянки підвищеної рентгенщільності кістки формувалися по периметру від кісткового дефекта. На відміну від інших груп, у 4-й дослідній (рис. 4.4, д) найбільш чітко візуалізувалося місце дефекту, при цьому його краї були чітко окреслені колом з дещо підвищеною рентгенологічною щільністю, тоді як центральна частина, навпаки, була рентгенонегативна. На значній ділянці за межами дефекту структура кісткової тканини втрачалася разом із зменшенням рентгеноуцільності. Рентгенограми кролів 5-ї групи (рис. 4.4, е) характеризувалися зменшенням площі дефекту та локальним потужним посиленням у цій зоні рентгенологічної щільності, яка поширювалася за межі губчастої кістки на діяфіз.

Тобто у випадках застосування PRP – матеріалів суттєво зменшувалася інтенсивність запально-резорбтивної фази з більш раннім проявом остеогенних процесів, особливо у випадках використання PRF (2-а дослідна група) та i-PRF (3-я дослідна група). Проте за використання ксеногенного PRF запально-резорбтивні процеси подовжені в часі, що гальмує остеогенну реакцію. Водночас у разі остеозаміщення композитом PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700 має місце ранній і потужний розвиток остеогенних процесів.



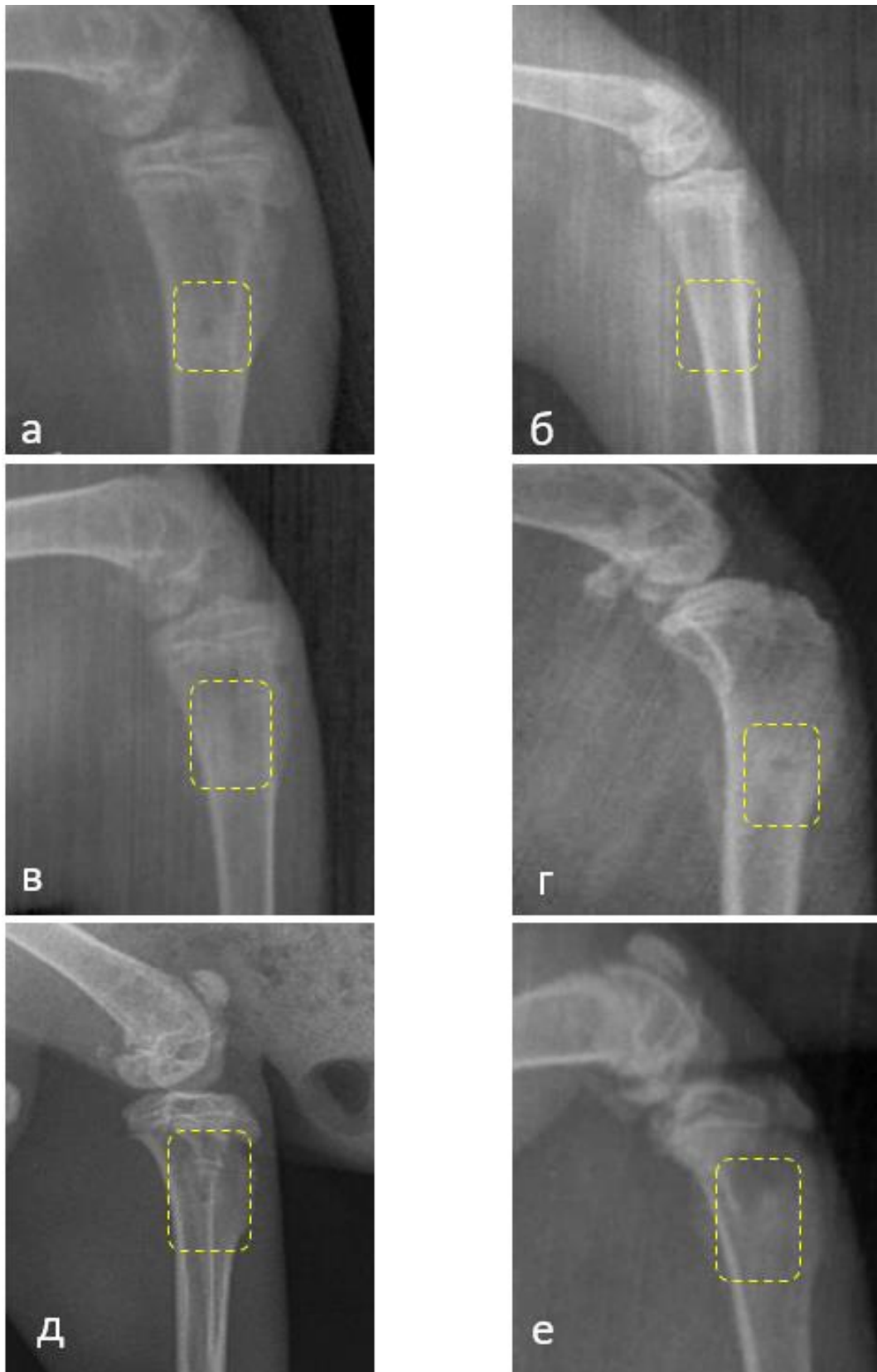
**Рис. 4.4. Рентгенограми проксимальних ділянок великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) дослідні групи**

На 21-у добу репаративного остеогенезу в тварин контрольної групи рентгенологічно (рис. 4.5, а) місце кісткового дефекту простежувалося досить добре, по периметру від якого була помірно підвищена рентгенологічна щільність, що поширювалася проксимальніше та дистальніше, чітко прослідковувалася періостальна реакція, тобто в цілому відбувалося наростання явищ остеогенезу.

Водночас у 1-й дослідній групі (рис. 4.5, б) кістковий дефект ледь візуалізувався, навколо нього виявлялося неоднорідне посилення рентгенологічної щільності з помірно періостальною реакцією. Подібною була рентгенокартина і у тварин 2-ї дослідної групи (рис. 4.5, в), але з дещо меншою рентгенщільністю, проте на більшій площі кістки. В 3-й дослідній групі (рис. 4.5, г) невеликий залишок кісткового дефекту по периферії був окреслений рентгенощільним остеїдом з достатньо вираженою періостальною та ендоостальною реакціями з явищами остеосклерозу. Проте, у 4-й дослідній групі (рис. 4.5, д), порівняно з іншими, чітко простежувалося місце модельованого кісткового дефекту із слабо окресленою ділянкою на його периферії дещо підвищеної рентгенщільності за наявності реакції периосту в межах метафізу великогомілкової кістки. На рентгенограмах кролів 5-ї дослідної групи (рис. 4.5, е), відмічали точковий остеосклероз на місці кісткової травми, посилення і поширення підвищеної рентгенщільності проксимально і дистально, незначні залишки періостальної реакції.

Отже, в групах застосування аутологічних PRP – матеріалів у період 21-ої доби, головним чином, відбувався перебіг остеогенних процесів різної інтенсивності та переважно з боку ендоосту, тоді як у випадку з ксеногенним PRF остеогенні процеси виконували роль біологічного бар'єра. У разі ж остеозаміщення композитним матеріалом загоєння кісткового дефекту рентгенологічно було ближчим до первинного типу.

На заключному етапі рентгенологічного дослідження, в період 42-ої доби, також встановлені певні відмінності між групами. Так, у контрольній групі (рис. 4.6, а) місце кісткового дефекту ледь прослідковувалося, навколо



**Рис. 4.5. Рентгенограми проксимальних ділянок великогомілкових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/β-TCP-700) дослідні групи**

нього окреслювалася досить широка зона підвищеної рентгенщільності, що дещо виходила за межі лінії періосту, а поза нею, проксимально і дистально були ділянки плямистого остеопорозу як ознака залучення в процес остеогенезу і ремоделювання ділянок великогомілкової кістки поза межами кісткової травми.

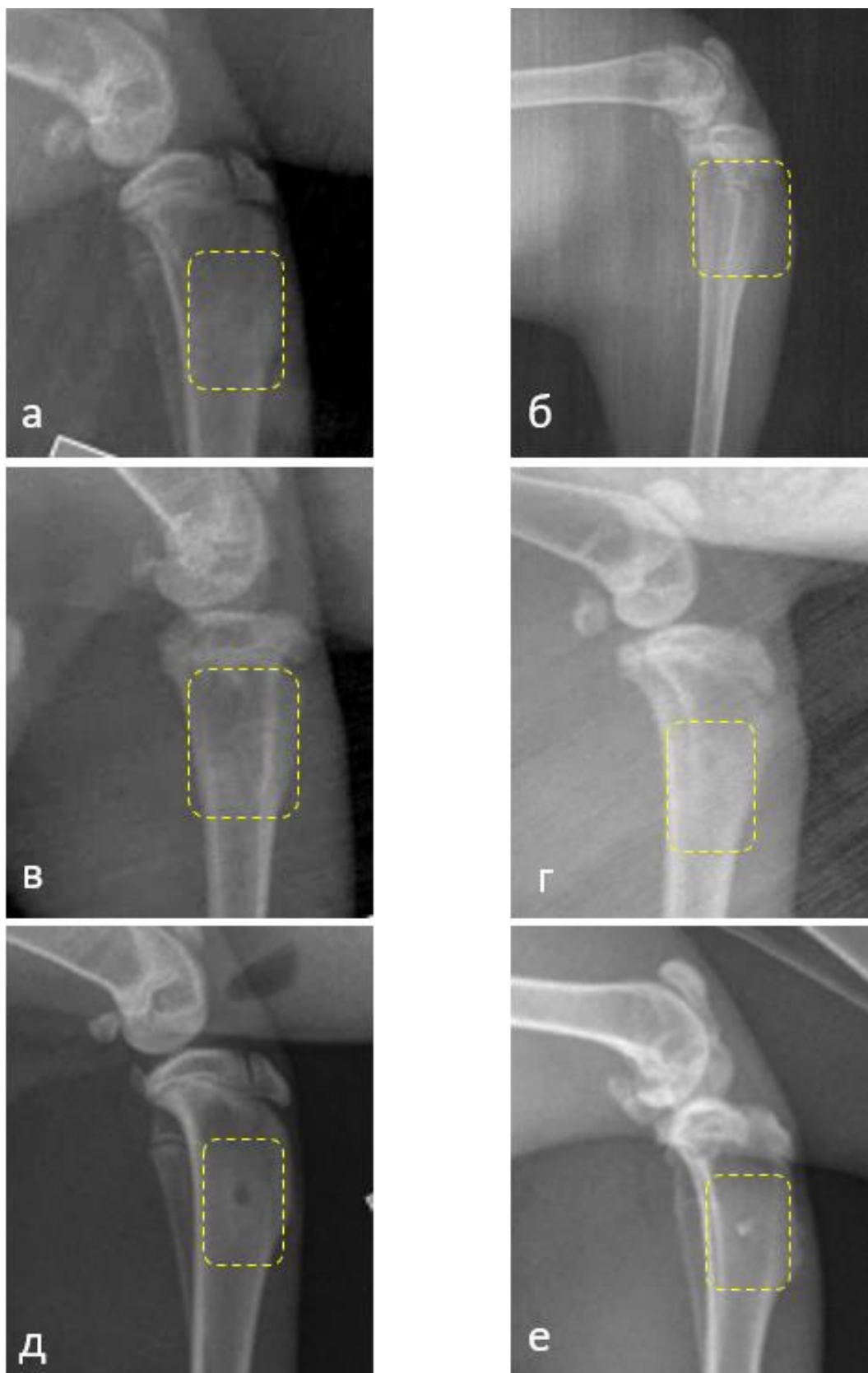
У випадку використання PRP (рис. 4.6, б, 1-а дослідна група) ці процеси відбувалися в межах метафіза з вираженим остеосклерозом у центрі та з суттєво меншими рентгенощільністю періосту та його розширенням, що у 2-й групі (рис. 4.6, в, PRF) вирізнялося більш широкою зоною остеосклерозу навколо ділянки кісткової травми.

За використання і-PRF (рис. 4.6, г, 3-я дослідна група) характерною була ще більша зона підвищеної рентгенощільності з її подовженням на кістково-мозковий канал діафіза, але з ледь помітною точкою місця кісткового дефекту. Разом з тим останній у 4-й дослідній групі (рис. 4.6, д) був чітко окресленим і рентгенонегативним, а навколо нього візуалізувався також добре окреслений квадрат з деяким підвищенням рентгенщільності. Натомість за композитного остеозаміщення (рис. 4.6, е, 5-а дослідна група) точково візуалізувався залишок гранули гідроксиапатитної кераміки в стані резорбції, а рентгенологічна структура метафізу була близькою до її норми.

#### **4.2. Макроморфологічне дослідження кісткових регенератів**

За макроморфологічного дослідження фрагментів променевих кісток на 14-у добу репаративного остеогенезу в кролів контрольної групи (рис. 4.7, а) у ділянці кісткового дефекту виявили сформований фіброзно-хрящовий регенерат у вигляді нерівномірного масивного розростання, що підвищувалося над зоною дефекту. У групі PRP (рис. 4.7, б) регенерат заповнював кістковий дефект і був вкритий періостом. У 2-й дослідній групі з PRF (рис. 4.7, в) сформована фіброзно-хрящова тканина дещо підіймалася над поверхнею кістки, але не виходила за межі дефекту. Натомість, за використання і-PRF (рис. 4.7, г) періостальна реакція виявилася досить





**Рис. 4.6. Рентгенограми проксимальних ділянок великогомілкових кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) дослідні групи**

потужною по периметру кісткової травми, а власне місце дефекту мало вигляд незначного заглиблення.

За використання ксеногенного PRF (рис. 4.7, д) регенерат фіброзного характеру не мав щільного контакту з краями кісткового дефекту. Навколо ділянки кісткової травми лише з одного боку сформувалася фіброзно-хрящова тканина у невеликому об'ємі. Водночас у групі, де імплантували PRF з кальцій-фосфатною керамікою (рис. 4.7, е) гранули керамічного матеріалу були досить добре інтегровані у регенерат хрящового типу, що не виходив за межі кісткової травми і щільно контактував з краями кісткового дефекту.

Далі, на 21-шу добу репаративного остеогенезу макроморфологічна картина кісткових регенератів суттєво змінилася. Зокрема, у контрольній групі (рис. 4.8, а) регенерат був кратероподібної форми, а його об'єм дещо збільшився, порівняно з попереднім терміном. У той же час у 1-й дослідній групі з PRP (рис. 4.8, б) значні за об'ємом розростання періосту поширювалися по периметру кісткової травми. У 2-й дослідній групі з PRF (рис. 4.8, в) об'єм регенерату над кісткою дещо зменшився та ущільнився. За використання і-PRF (рис. 4.8, г) попереднє заглиблення у ділянці кісткового дефекту повністю виповнилося новоутвореною тканиною, а розростання регенерату набували масивного характеру. У 4-й дослідній групі з ксеногенним PRF (рис. 4.8, д) за відсутності виразних ознак періостальної реакції фіброзний регенерат, дещо м'якої консистенції, вже мав контакт з краями материнської кістки.

На відміну від інших, у 5-й дослідній групі (рис. 4.8, е) кістковий дефект після остеозаміщення композитним матеріалом був заповнений щільним регенератом із фрагментами біоактивної кераміки, які були за його межами, що свідчило про їх поступову резорбцію.

На 42-гу добу в компактній кістковій тканині променевої кістки контрольної групи (рис. 4.9, а) відмічали суттєве зменшення об'єму регенерату, який ледь підіймався безпосередньо над місцем дефекту та виразно був світлішим за материнську кістку. В цей час у 1-й та 3-й дослідних

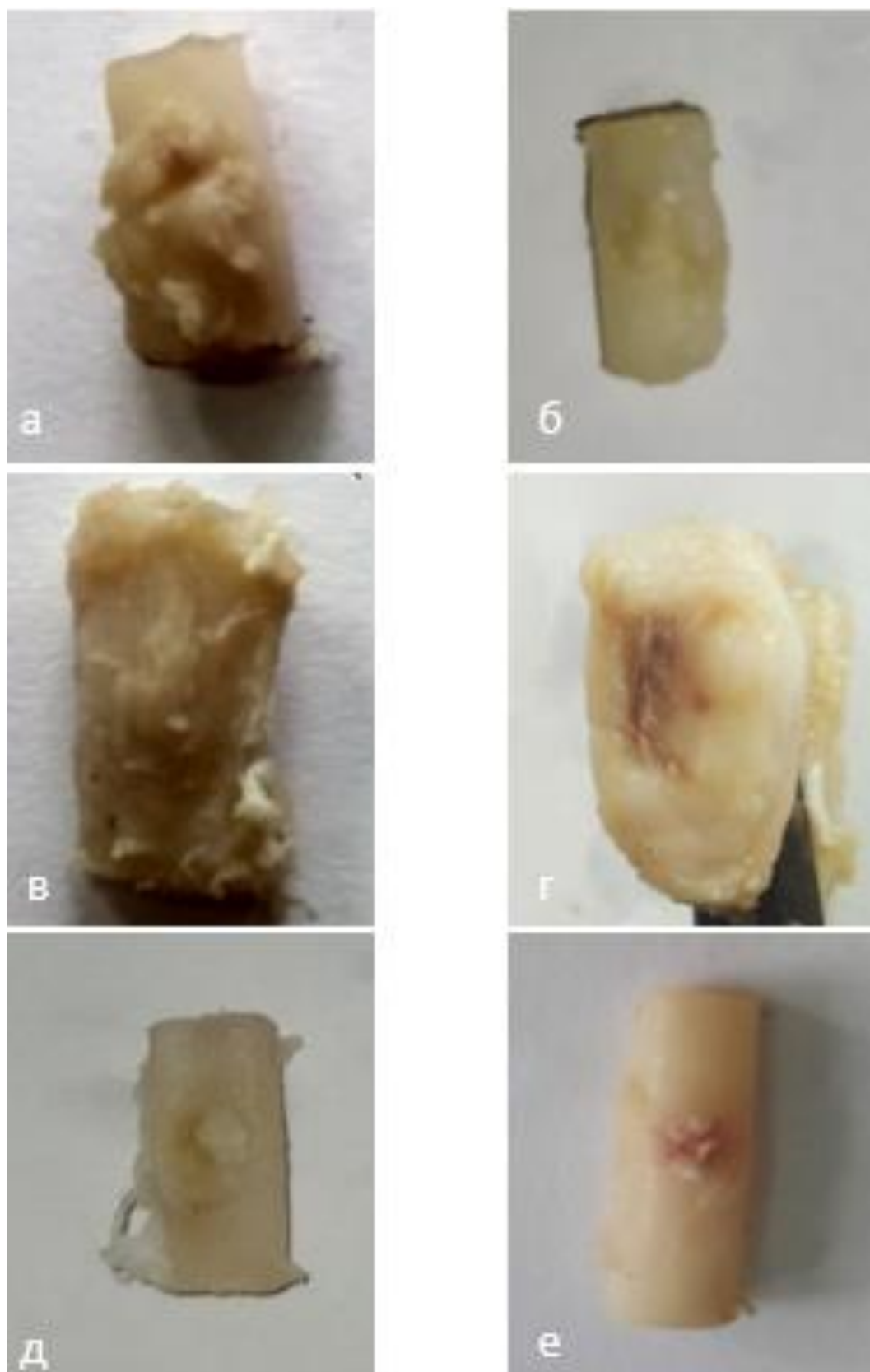
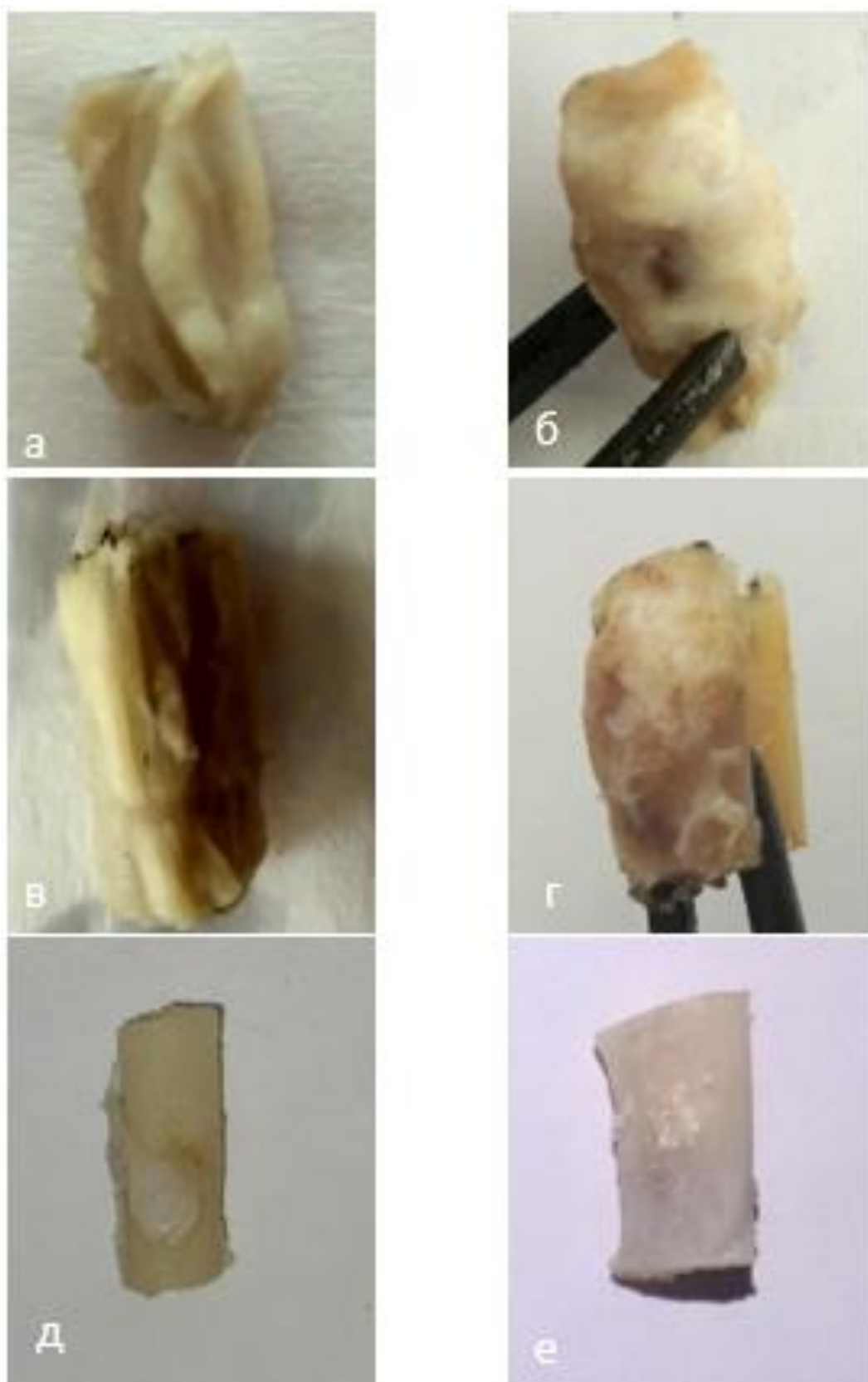
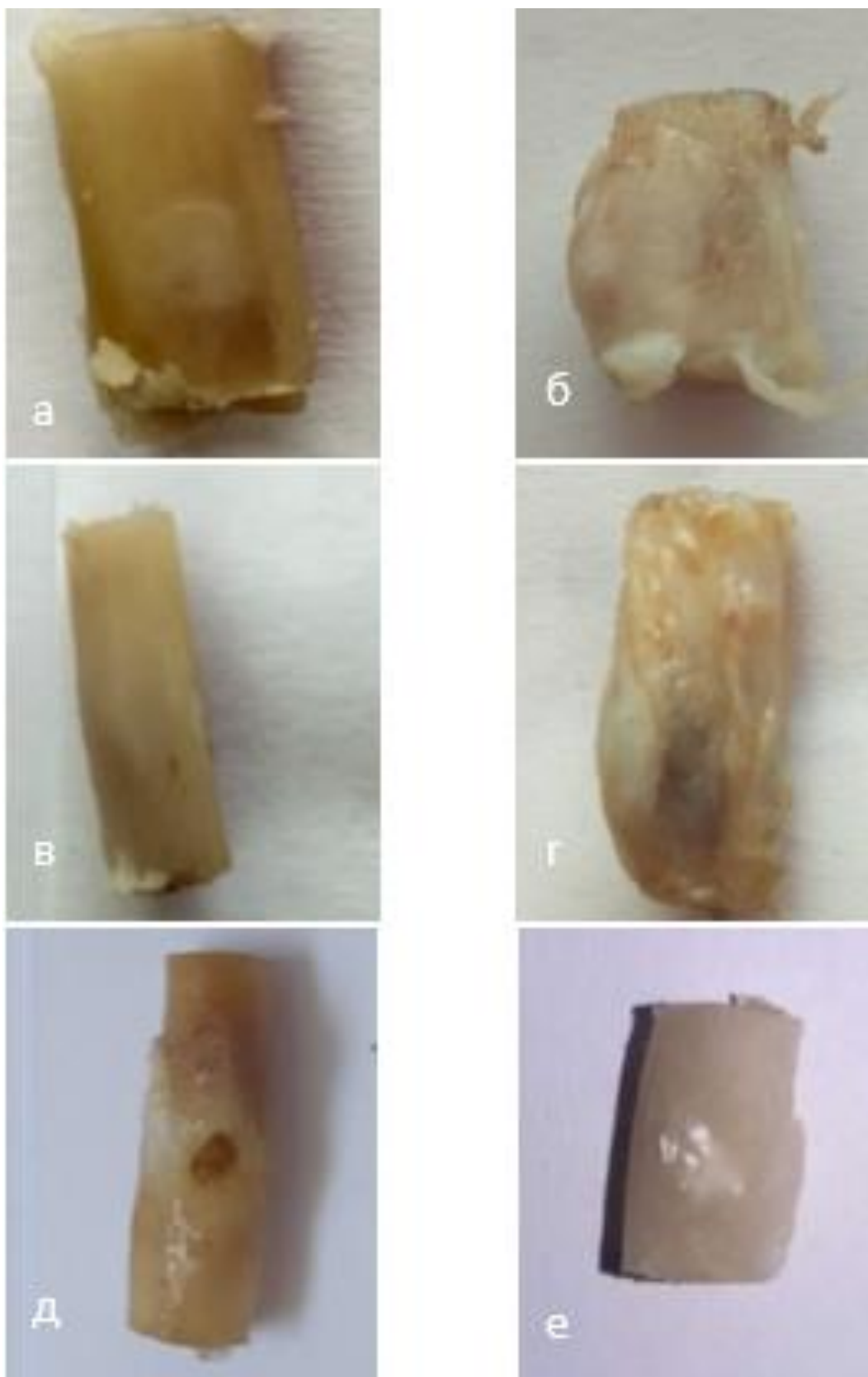


Рис. 4.7. Макрокартини фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) дослідні групи



**Рис. 4.8. Макрокартини фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/β-TCP-700) дослідні групи**



**Рис. 4.9. Макрокартини фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/β-TCP-700) дослідні групи**

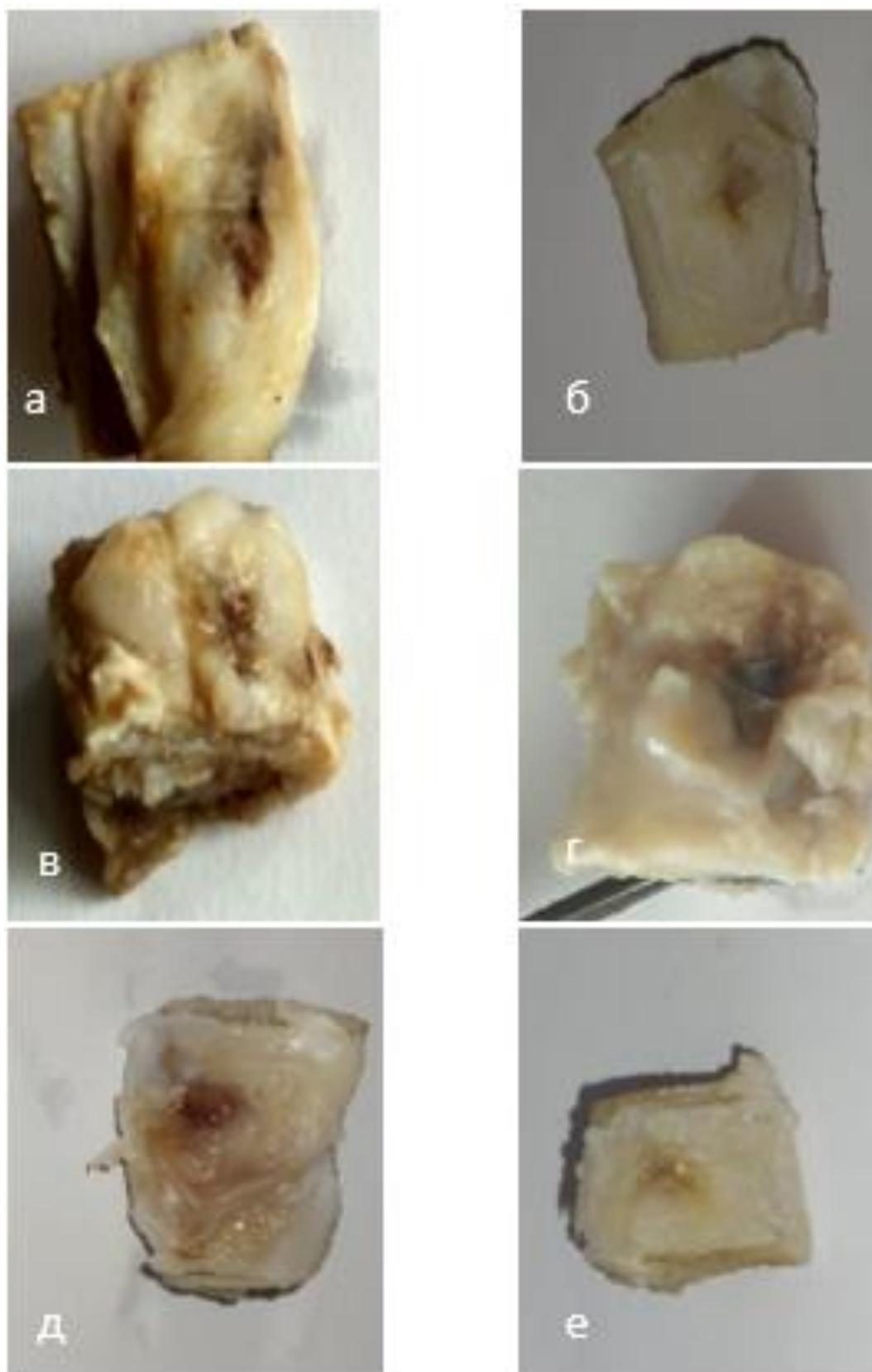
групах (рис. 4.9, б, г) відмічали досить масивні та ущільнені розростання періосту, проте дещо менші за об'ємом від попереднього терміну дослідження. Проте, у 2-й (рис. 4.9, в) – місце дефекту вже не візуалізувалося, а сформований регенерат був представлений кістковою тканиною і проглядався у вигляді ледь помітного підвищення.

Макрокартина кісткових регенератів у 4-й групі (рис. 4.9, д) мала суттєві відмінності. У ділянці кісткової травми проглядалося виразно окреслене заглиблення із заокругленими нерівними краями, а навколо нього відмічали помірні розростання періосту. У 5-й дослідній групі за композитного остеозаміщення (рис. 4.9, е) місце кісткової травми не відрізнялося від материнської кістки і лише вирізнялося білими плямами деградованих гранул композиту.

Отже, за макроморфологічною картиною кісткового регенерату застосування PRF та комбінації PRF з HA/ $\beta$ -TSP-700 за модельних переломів компактної кісткової тканини формується оптимізований кістковий мозоль безпосередньо у межах кісткового дефекту. За використання i-PRF та PRP стадії репаративного остеогенезу мають дещо гіперергічний характер перебігу. Поряд з цим, ксеногенний PRF зумовлює гіперергічний характер запально-резорбтивної стадії, що зумовлює гальмування репаративного остеогенезу.

Макроморфологічне дослідження кісткових регенератів губчастої речовини гребенів великогомілкових кісток мало певні відмінності. У контрольних зразках на 14-ту (рис. 4.10, а) добу кістковий дефект був заповнений фіброзно-хрящовим регенератом із заглибленням, дещо ширшим за розміри попередньо змодельованого. По його краях мало місце помірне розростання періосту. У 1-й дослідній групі (рис. 4.10, б) регенерат був майже плоским, а розростання періосту були помірні та добре окреслені, тоді як у 2-й дослідній (рис. 4.10, в) дещо більші за об'ємом, а у 3-й (рис. 4.10, г) – потужні та підвищені навколо місця кісткової травми.

У 4-й групі (рис. 4.10, д) кістковий дефект був виповнений нещільним регенератом червонуватого кольору, а періостальні розростання, лише з



**Рис. 4.10. Макрокартини фрагментів проксимальних ділянок великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) дослідні групи**

одного боку від нього, мали вигляд нашарувань.

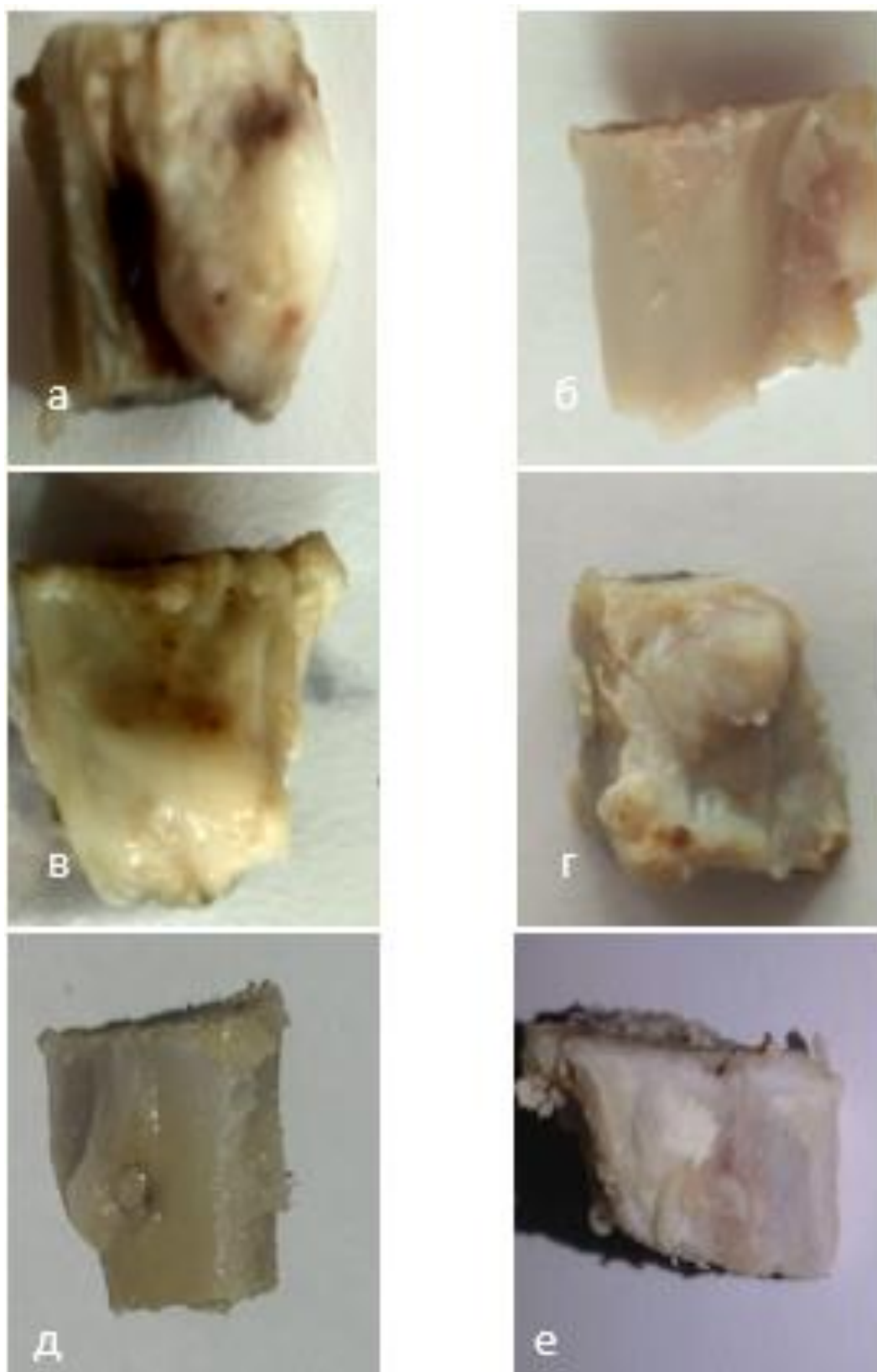
На відміну від усіх груп, у 5-й дослідній групі (рис. 4.10, е) кістковий дефект фактично був виповнений регенератом, у якому проглядалися фрагменти композитного матеріалу, а періостальне розростання було плоске і невелике за площею.

На 21-у добу в зразках контрольної групи (рис. 4.11, а) сформований регенерат суттєво підвищувався над місцем дефекту і відрізнявся за кольором від материнської кістки. В 1-й дослідній групі (рис. 4.11, б) об'єм регенерату над кісткою був суттєво шороховатим і щільним. У 2-й дослідній групі (рис. 4.11, в) регенерат дещо піднімався над поверхнею кістки, але був суцільним і гладеньким, тоді як у 3-й дослідній (рис. 4.11, г) кістковий мозоль значно виступав над поверхнею кістки навколо кісткової травми. На відміну від попередніх груп у 4-й дослідній (рис. 4.11, д) новоутворена тканина, яка заповнювала дефект, була не щільної структури і мала слабкий контакт з його краями, а періостальна реакція охоплювала лише 1/3 частину периметра кісткової травми, утворений мозоль досить виразно підвищувався над поверхнею кістки.

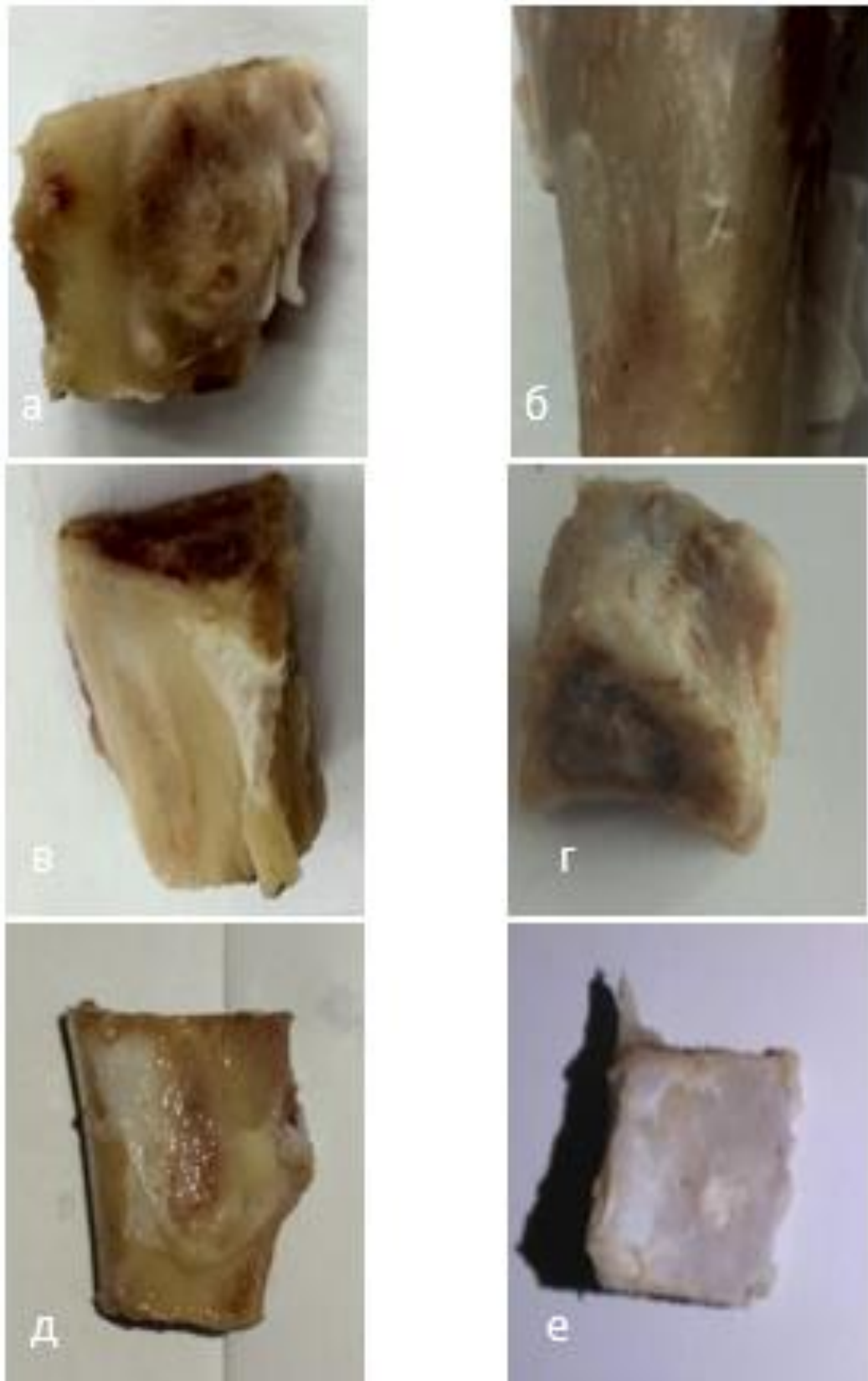
Натомість у 5-й дослідній групі (рис. 4.11, е) на місці кісткової травми було незначне потовщення периосту, в межах якого проглядалися залишки композитного матеріалу.

На кінець дослідження, на 42-гу добу, в контрольній групі (рис. 4.12, а) відмітили помірні, шороховаті, помірно щільні нашарування периосту. У 1-й дослідній групі (рис. 4.12, б) шороховата поверхня периосту була більшою за площею, ніж у 2-й (рис. 4.12, в), тоді як у 3-й дослідній групі (рис. 4.12, г) ділянка кісткової травми мала нашарування периосту. В 4-й дослідній групі (рис. 4.12, д), за використання ксеногенного PRF, місце дефекту чітко візуалізувалося, а навколо нього з одного боку простежувалося формування кісткового мозоля, який розміщувався дистальніше від кісткової травми. Натомість у 5-й групі (рис. 4.12, е) залишки гранул кальцій-фосфатної кераміки надавали кістковому регенерату білуватого відтінку, поверхня якого була глянцева, щільна і монолітна з материнською кісткою.





**Рис. 4.11. Макрокартини фрагментів проксимальних ділянок великогомілкових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700) дослідні групи**



**Рис. 4.12. Макрокартини фрагментів проксимальних ділянок великогомілкових кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу: а – контрольна (під кров'яним згустком); б – 1-а (PRP); в – 2-а (PRF); г – 3-я (i-PRF); д – 4-а (ксенологічний PRF); е – 5-а (PRF+HA/β-TCP-700) дослідні групи**

Бальна макроморфологічна оцінка кісткових регенератів (табл. 4.1) за їх об'ємом, щільністю та ступенем контакту з материнською кісткою фактично не залежала від речовини кісткової тканини – губчаста чи компактна. За імплантації ксенологічного PRF її показники, починаючи з 21-ої доби репаративного остеогенезу, були меншими, ніж у контрольній групі, в 1,6–2,8 рази ( $p < 0,05–0,001$ ). Натомість за імплантації PRF чи композитного остеозаміщення вони виявилися більшими в 1,3–1,4 рази ( $p < 0,05$ ) та 1,3–1,8 рази ( $p < 0,01–0,001$ ), відповідно, що засвідчує їх остеоіндуктивні та остеointegraційні властивості.

У період 21-ї доби у 4-й дослідній групі рівень заповнення дефекту регенератом у 2,8 рази ( $p < 0,05$ ), його щільність у 1,6 рази ( $p < 0,05$ ), а контакт з материнською кісткою в 1,7–2 рази ( $0,05–0,001$ ) були нижчими за показники контрольних зразків, тоді як у 5-й групі щільність регенерату була вищою і становила 1,6–2,1 рази ( $p < 0,01$ ).

На 42-у добу за остеозаміщення ксенологічним PRF (4-а дослідна група) за усіма критеріями регенерату показники були нижчими у 2–3 рази ( $p < 0,05–0,001$ ) у порівнянні зі зразками контрольної групи. Натомість у 3-й і 5-й дослідних групах заповнення дефектів регенератом у 1,3–1,4 рази ( $p < 0,05$ ) та його щільність у 1,3–1,8 рази ( $0,05–0,001$ ) були вищими за показники контрольних зразків.

З огляду на бальну оцінку сформованих регенератів у модельованих дефектах як губчастої, так і компактної речовини кісткової тканини, за впливом на репаративний остеогенез, PRP-матеріали можна розмістити в наступній послідовності: ксенологічний PRF < кров'яний згусток < PRP < i- PRF < PRF < PRF+HA/ $\beta$ -TSP–700.

Отже, за результатами бальної оцінки регенератів зразків кісткової тканини PRF та комбінація PRF з HA/ $\beta$ -TSP–700 показали, що застосування за модельних переломів цього типу аутологічних тромбоцитарних концентратів володіє достатніми остеоіндуктивними та остеокондуктивними властивостями. Це підтверджує перспективність застосування саме аутологічних матеріалів, що містять підвищену концентрацію тромбоцитів.

Таблиця 4.1

## Бальна оцінка макроморфологічної структури кісткових регенератів за остеозаміщення PRP та PRF

Доба	Макроморфологічні критерії регенерату	Тип кісткової тканини	Контрольна група (n=4)	PRP (n=4)	PRF (n=4)	I-PRF (n=4)	Ксенологічний PRF (n=4)	PRF+HA/β-TCP-700 (n=4)
			бали					
14	I	к	2,75 ± 0,25	2,75 ± 0,25	3,0 ± 0,0	2,5 ± 0,29	1,5 ± 0,5	3,0 ± 0,0
		г	1,5 ± 0,5	2,0 ± 0,0	2,25 ± 0,25	2,25 ± 0,25	1,5 ± 0,5	2,0 ± 0,0
	II	к	1,0 ± 0,0	1,25 ± 0,25	1,25 ± 0,29	1,25 ± 0,25	1,5 ± 0,29	1,5 ± 0,29
		г	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,29	1,75 ± 0,25*	1,5 ± 0,29	1,0 ± 0,0	1,75 ± 0,25*
	III	к	2,5 ± 0,29	2,5 ± 0,29	2,75 ± 0,25	2,75 ± 0,25	1,25 ± 0,25*	2,75 ± 0,25
		г	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,25 ± 0,25	2,0 ± 0,0	1,5 ± 0,29	2,0 ± 0,0
21	I	к	2,5 ± 0,29	2,5 ± 0,29	2,75 ± 0,25	2,75 ± 0,25	2,75 ± 0,25	3,0 ± 0,0
		г	2,75 ± 0,25	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	1,0 ± 0,58*	3,0 ± 0,0
	II	к	1,75 ± 0,25	1,75 ± 0,25	2,25 ± 0,25	2,0 ± 0,0	1,25 ± 0,25	3,75 ± 0,25**
		г	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,25 ± 0,25	2,0 ± 0,0	1,25 ± 0,25*	3,25 ± 0,25**

Продовження таблиці 4.1

	III	к	$2,5 \pm 0,29$	$2,75 \pm 0,25$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,29^*$	$3,0 \pm 0,0$
		г	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,29^{**}$	$3,0 \pm 0,0$
42	I	к	$2,75 \pm 0,25$	$3,0 \pm 0,0$	$3,75 \pm 0,25^*$	$3,5 \pm 0,29$	$1,0 \pm 0,58^*$	$3,75 \pm 0,25^*$
		г	$3,0 \pm 0,0$	$3,5 \pm 0,29$	$3,75 \pm 0,25^*$	$3,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,58^*$	$3,75 \pm 0,25$
	II	к	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,75 \pm 0,25^*$	$3,0 \pm 0,0$	$1,25 \pm 0,25^{***}$	$4,0 \pm 0,0$
		г	$2,25 \pm 0,25$	$2,75 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25^*$	$3,25 \pm 0,25^*$	$1,5 \pm 0,29$	$4,0 \pm 0,0^{***}$
	III	к	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$1,25 \pm 0,25^{***}$	$3,0 \pm 0,0$
		г	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,29^{**}$	$3,0 \pm 0,0$

**Примітки:** 1.) **I – Візуалізація дефекту:** чітко видимий – 0, частково виповнений регенератом – 2, дефект повністю заповнений регенератом – 3, дефект не візуалізується (або тільки за рахунок композитного матеріалу) – 4;  
**II – щільність регенерату у місці дефекту:** не щільний – 1, щільний фіброзно-хрящовий регенерат – 2, щільний, представлений кістковою тканиною – 3, щільний, представлений кістковою тканиною, яка не відрізняється від навколишніх тканин – 4;  
**III – контакт регенерату з материнською кісткою:** відсутній – 1, частковий, не рівномірний – 2, рівномірний, міцний – 3.

К – компактна кісткова тканина, г – губчаста тканина.

2.) значення  $p$ : 0,05 – \*; 0,01 – \*\*; 0,001 – \*\*\*, порівняно з контрольною групою.

### 4.3. Гістоморфологічна оцінка регенератів кісткової тканини

За імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів у кісткові дефекти та їх остеозаміщення композитом PRF із HA/ $\beta$ -TCP-700 гістоморфологічна картина репаративного остеогенезу виявилася наступною. Зокрема, у контрольній групі кролів на його 14-ту добу (рис. 4.13) в діафізарних

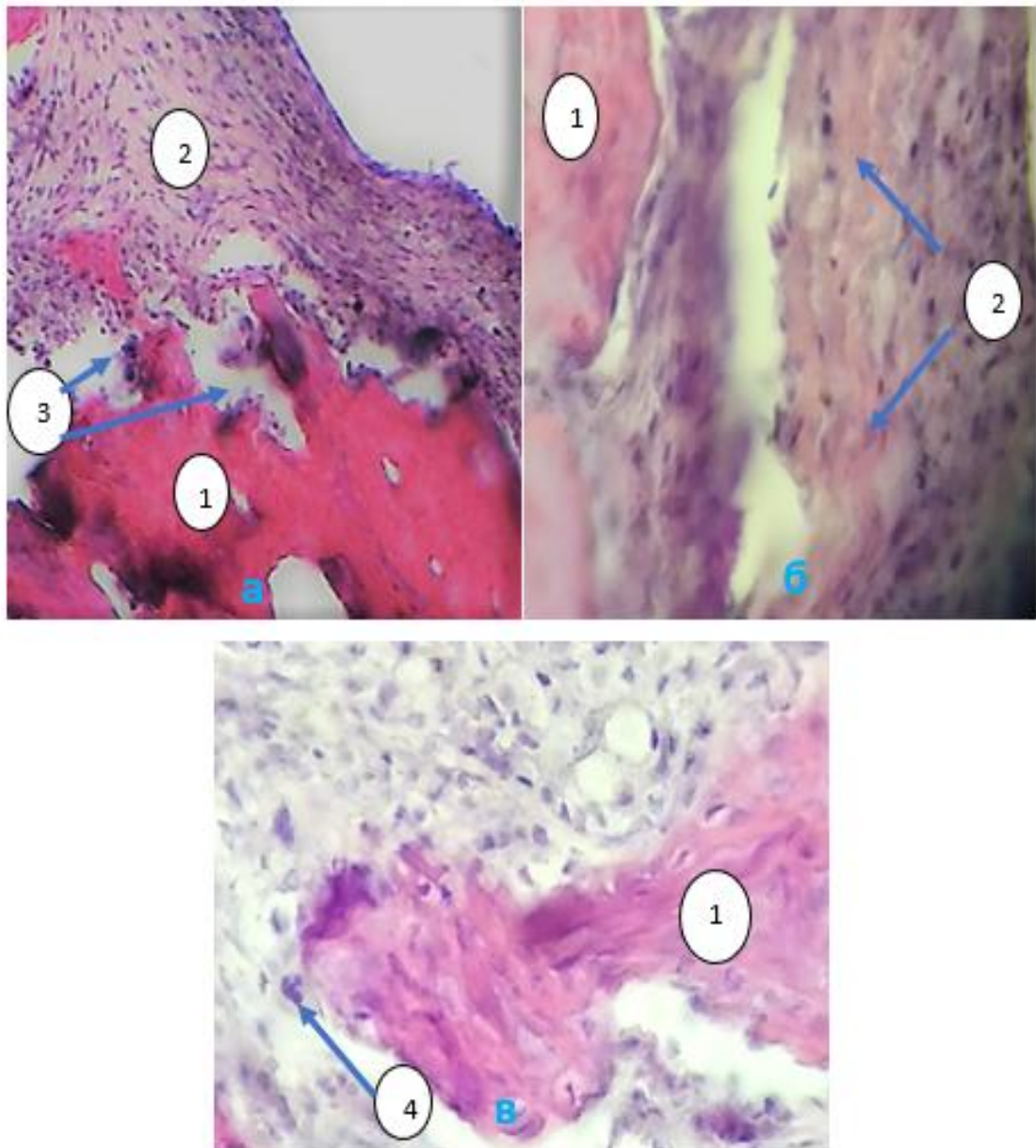


Рис. 4.13. Гістокартина фрагментів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (контрольна група): 1 – материнська кістка; 2 – пучки колагенових волокон; 3 – відсутність контакту з материнською кісткою; 4 – остеокласт біля краю материнської кістки.

Гематоксилін і еозин, а – х 100; б, в – х 400

регенератах компактної речовини в центральній ділянці та на периферії кісткового дефекту відмічали агрегацію впорядкованих пучків колагенових волокон, які щільно прилягали один до одного, але не мали повного контакту з материнською кісткою. У регенераті візуалізувалися ядра малодиференційованих клітин остеобластичного ряду. На межі з материнською кісткою відмічали явища остеорезорбції, за рахунок наявності остеокластів.

Водночас у випадку використання PRP (рис. 4.14, 1-а дослідна група) регенерат був представлений різнонаправленими не щільно розміщеними пучками волокнистого комплексу в значному об'ємі, що містив у своєму складі ядра клітин фібробластичного та остеобластичного рядів. У регенераті з боку кісткового мозку починали формуватися тяжі ретикулофіброзної кісткової тканини, які мали поздовжнє розміщення, а центральна ділянка була заповнена щільним скупченням ядер клітин фібробластичного ряду та міжклітинним матриксом. Також у зразках цієї групи реєстрували значну кількість судин різного діаметру, що свідчить про активну неоваскуляризацію та, відповідно, збільшенню рівня оксигенації.

У 2-й дослідній групі з PRF (рис. 4.15) також виявили формування комплексу волокнистих структур, проте, з однобічним спрямуванням, спрямуванням, між якими містилися значна кількість ядер малодиференційованих клітин.

Натомість, за використання і-PRF (рис. 4.16, 3-я дослідна група) на периферії та у центрі дефекту біля його дна реєстрували початок формування трабекул кісткової тканини, між якими розміщувалася ретикулярна тканина. Як і у зразках 2-ї дослідної групи, відмічали велику щільність ядер клітин остеобластичного ряду в смужках ретикулофіброзної кісткової тканини, яка знаходилася у процесі формування.

Після заміщення ксенологічним PRF (рис. 4.17, 4-а дослідна група) на 14-ту добу регенерат у місці дефекту мав сітчасту структуру та заповнював

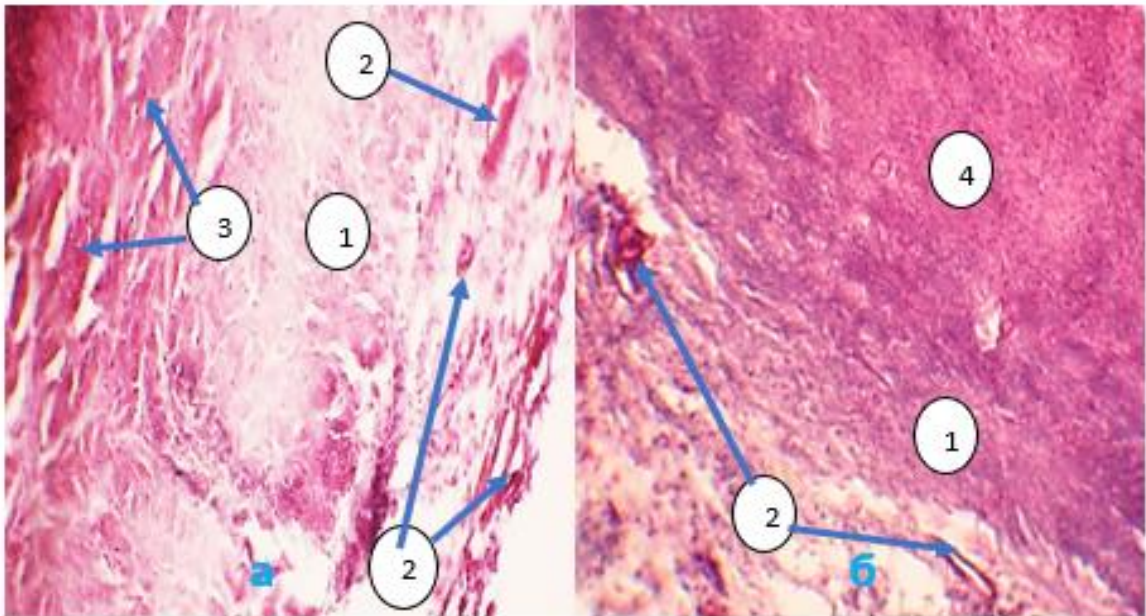


Рис. 4.14. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (PRP): 1 – волокнистий комплекс; 2 – судини різного діаметру; 3 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 4 – ядра клітин фібробластичного ряду. Гематоксилін і еозин, а – х 100, б – х 400

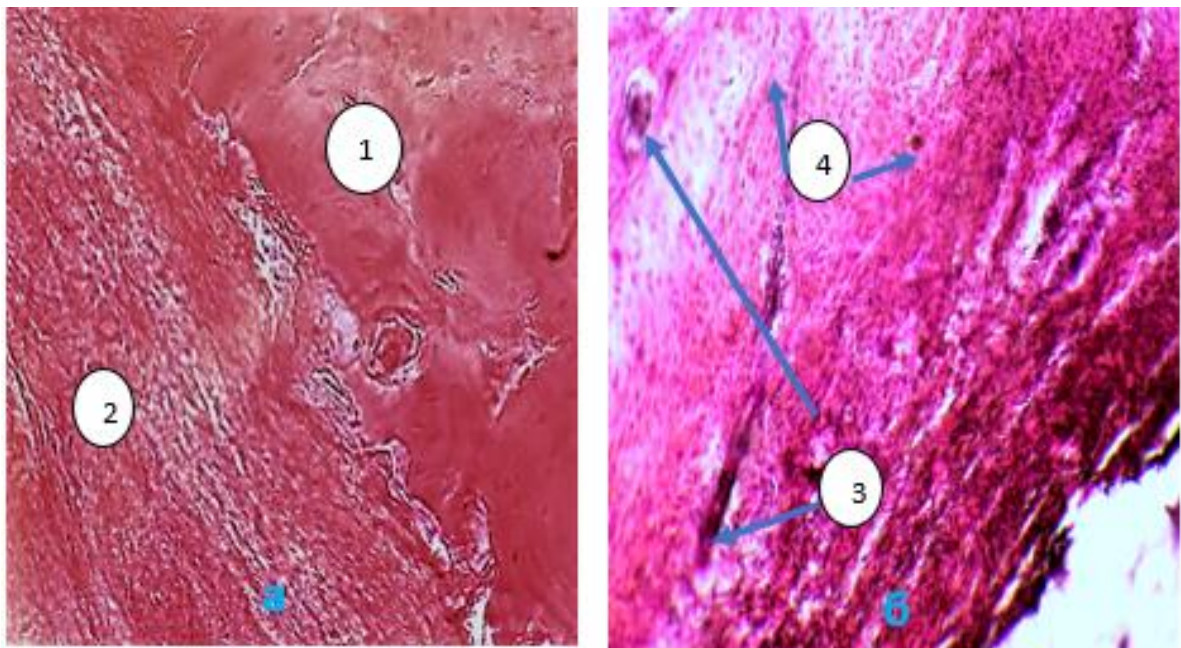


Рис. 4.15. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (PRF): 1 – материнська кістка; 2 – комплекс волокнистих структур; 3 судини; 4 – ядра клітин остеобластичного ряду. Гематоксилін і еозин, а – х 400, б – х 200



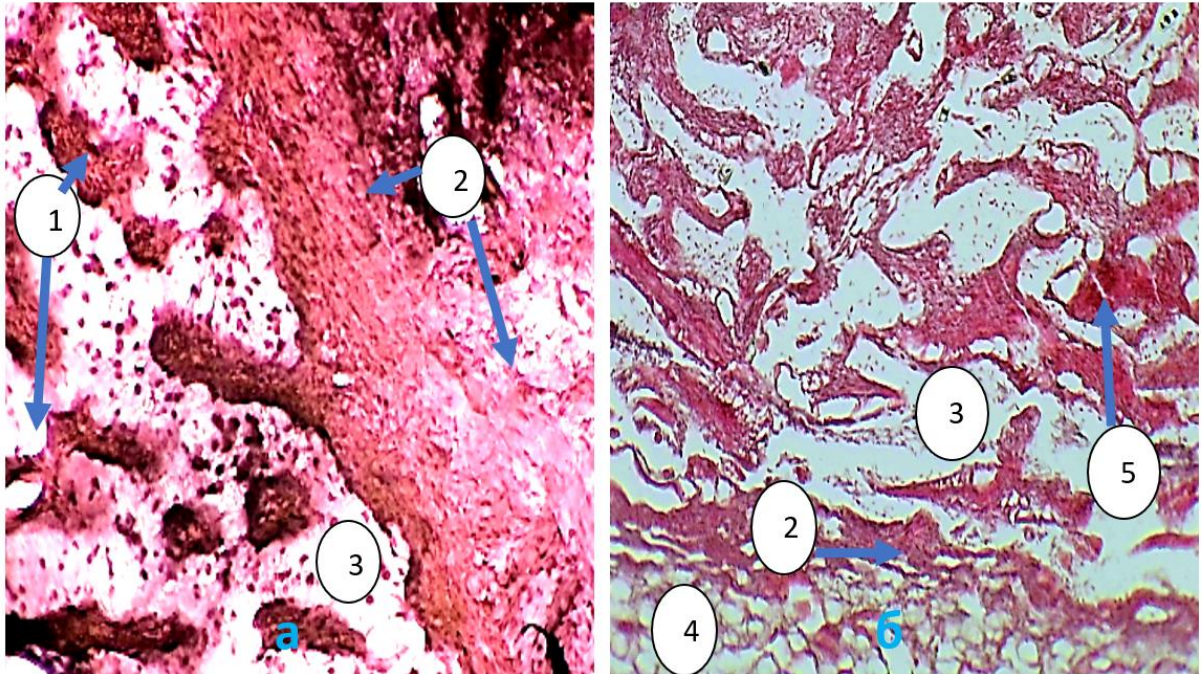


Рис. 4.16. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (i-PRF): 1 – трабекули кісткової тканини; 2 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 3 – міжбалкові простори; 4 – кістковий мозок; 5 – судини. Гематоксилін і еозин, а – х 400; б – х 100

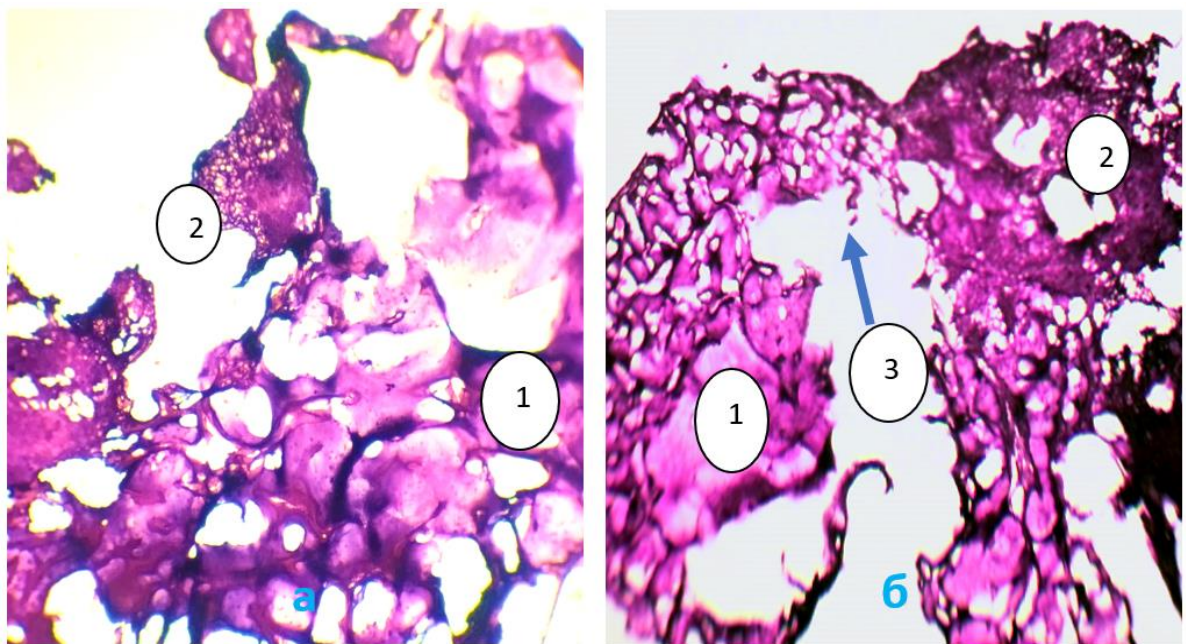


Рис. 4.17. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (ксенологічний PRF): 1 – материнська кістка; 2 – регенерат сітчастої структури; 3 – проміжки між материнською кісткою і регенератом. Гематоксилін і еозин, а – х 200; б – х 100

дефект не повністю. Відмічали великі порожнини біля країв материнської кістки. Щільність клітин була не високою.

В той же час у зразках кісткової тканини за використання PRF+HA/ $\beta$  TSP-700 (рис. 4.18, 5-а дослідна група) гранули композиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом знаходилися у оточенні молодої компактної речовини пластинчастої кісткової тканини, яка оточувала гранули по периферії та мала щільний контакт з ними. Вона була представлена значною кількістю кровоносних судин, розміщених у поздовжньому і поперечному напрямках. Навколо них відмічали початок формування концентрично нашарованих молодих остеонів, на відміну від попередніх груп у цей період дослідження, а також значну щільність ядер клітин остеобластичного ряду в їх товщі.

Отже, на 14-ту добу процеси регенерації у більшості груп перебігали з утворенням остеїду переважно у ділянках контакту з материнською кісткою, а в центральних частинах регенерат являв собою ретикулофіброзну кісткову волокнисту структуру з різним ступенем щільності та диференціації клітин фібро-, хондро-, остеогенного рядів. Проте, в 5-й дослідній групі відмічали формування значної кількості судин, а у центральній зоні модельованого дефекту та на периферії – осередки формування молодих остеонів, на відміну від інших груп.

В наступний термін дослідження, на 21-шу добу, гістологічна картина у всіх групах характеризувалася збільшенням частки новоутвореного регенерату з його перебудовою, появою судин у його складі. Зокрема, у контрольній групі (рис. 4.19) в центральній частині кісткового дефекту міжбалкові простори займали досить велику площу. Остеони знаходилися в процесі формування, а трабекули губчастої речовини в стані перебудови. Заповнення кісткового дефекту новоутвореною кістковою тканиною відбувалося нерівномірно. Кількість судин була помірною.

Водночас у 1-й дослідній групі (рис. 4.20) регенерат формувався переважно за рахунок ендостального остеогенезу. Це проявлялося початком утворення остеонів навколо значної кількості судинних каналів біля

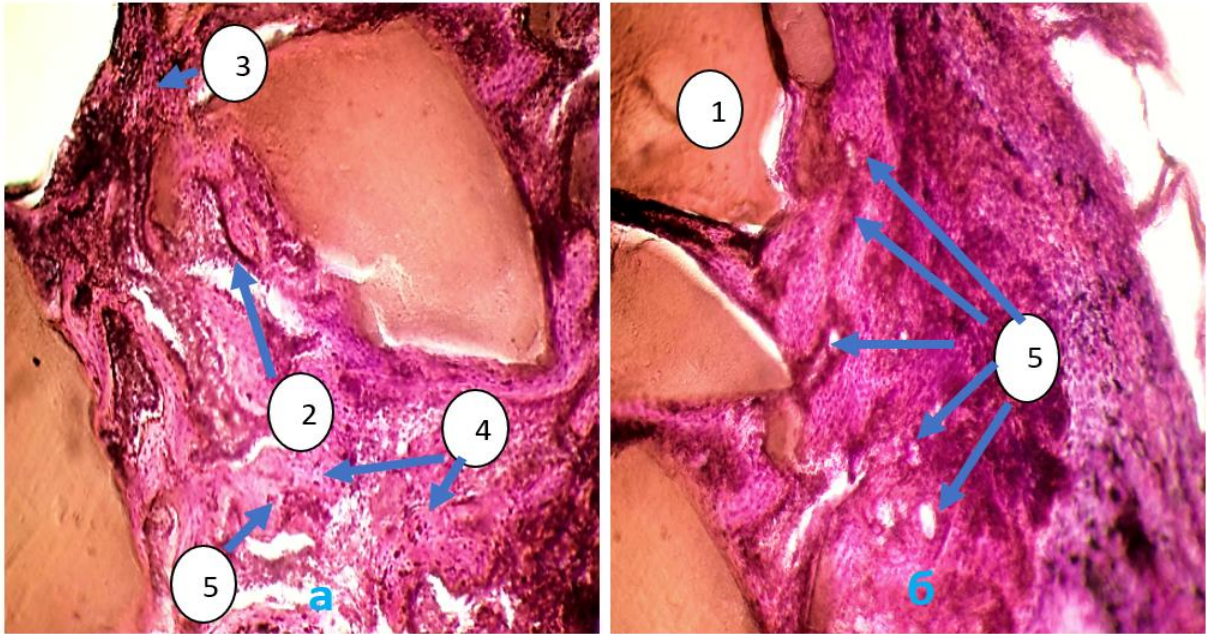


Рис. 4.18. Гістокартина фрагментів діяфізів променевиx кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (PRF+HA/β-TCP-700): 1 – гранула матеріалу; 2 – ряди ядер остеобластів; 3 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 4 – початок формування молодих остеонів; 5 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, а x 100; б x 400

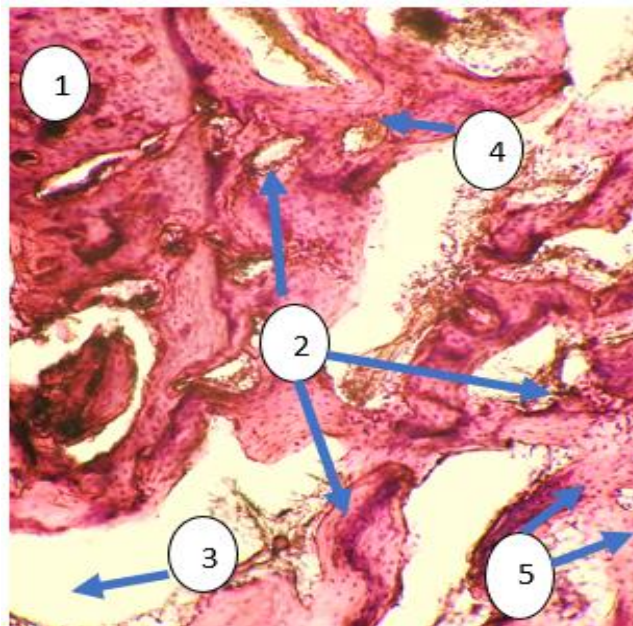


Рис. 4.19. Гістокартина фрагментів діяфізів променевиx кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (контрольна група): 1 – материнська кістка; 2 – розширені судинні канали; 3 – порожнина між балками; 4 – остеони у процесі формування; 5 – незамуровані остеоцити. Гематоксилін і еозин, x 200

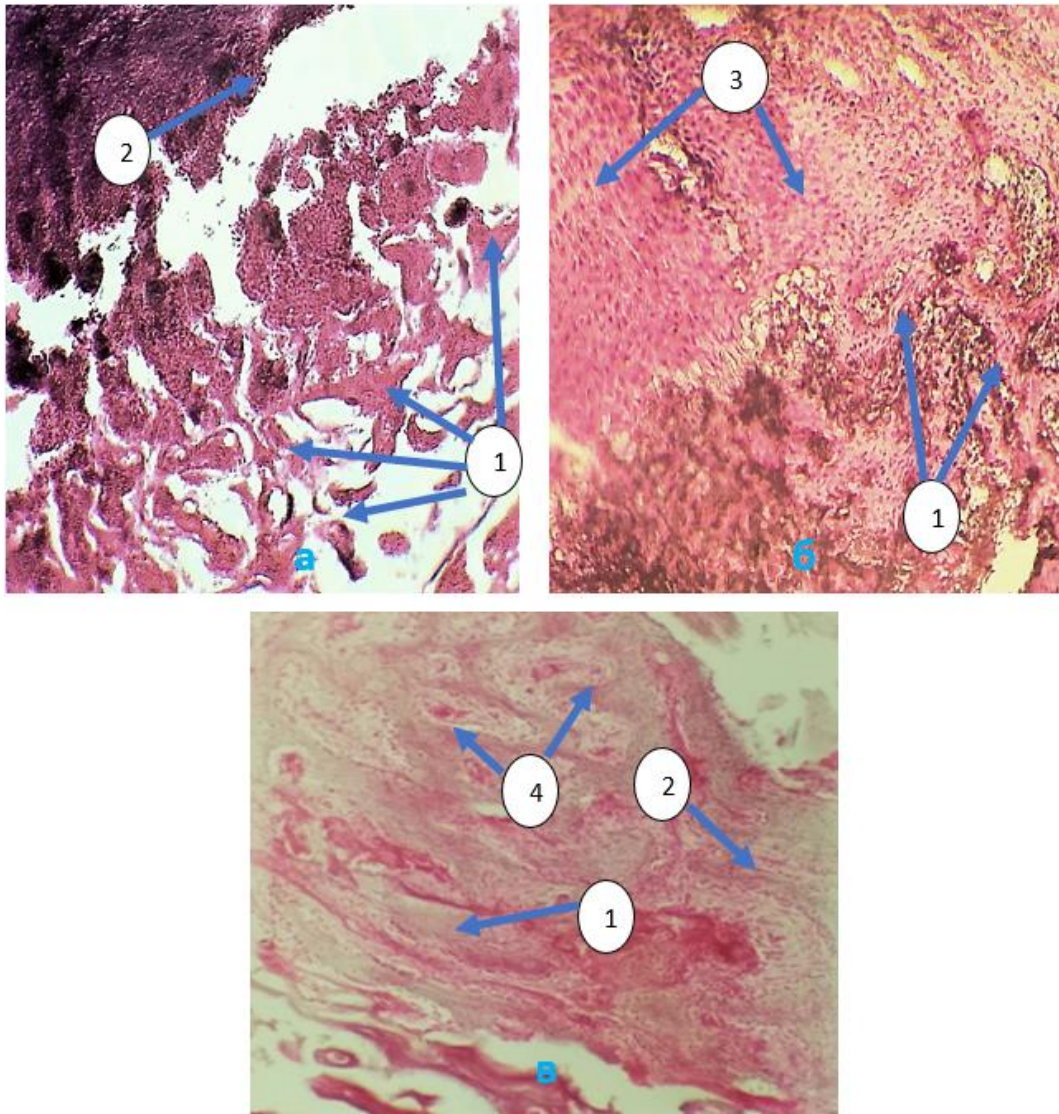


Рис. 4.20. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (PRP): 1 – балки губчастої речовини пластинчастої кісткової тканини; 2 – ретикулофіброзна тканина; 3 – ядра клітин остеобластичного ряду; 4 – початок концентричного нашарування пластинок компактної речовини навколо судинних каналів.

Гематоксилін і еозин, а – х 100, б, в – х 400

материнської кістки та залишками тяжів грубоволокнистої кісткової тканини у більшій мірі від дна кісткового дефекту, тобто, з боку кісткового мозку. Регенерат у центральній частині модельованого дефекту був представлений трабекулами губчастої будови і остеобластами на їх поверхні. Щільність ядер клітин у балках також була високою. Тобто відбувався початок нашарування кісткових пластинок та перебудова губчастих трабекул ретикулофіброзної

кісткової тканини.

У випадку застосування PRF (рис. 4.21, 2-а дослідна група), відбувалася виражена пошарова перебудова ретикулофіброзної тканини у балки губчастої будови в центрі дефекту зі значною кількістю клітин, зокрема остеоцитів, а на їх поверхні – остеобластів. На периферії дефекту та ближче до кістково-мозкової порожнини у кістковій тканині губчастої будови відмічали ознаки початку формування остеонів, а у центральних їх частинах – судини. Судинні канали мали великий діаметр та розгалуження. У компактній речовині, яка перебуває в стані перебудови, відмічали значну кількість замуrowаних в лакуни остеоцитів. Місцями візуалізувалися залишки ретикулофіброзної тканини. Тобто вже на 21-шу добу простежувалися ділянки окостеніння молоді кісткової тканини, на відміну від контрольної і 1-ї дослідної груп.

У цей період у зразках 3-ї дослідної групи (рис. 4.22) у місці дефекту на периферії реєстрували початок формування остеонів навколо судинних каналів. У балках знаходилися замуrowані остеоцити. Незначна кількість остеоцитів замуrowаних в остеоцитарні лакуни локалізувалися в складі пластинок остеонів. Гістологічна картина була подібною до контрольної групи, проте товщина кісткових балок була дещо більшою та відмічали щільніше їх розташування.

В той же час у зразках кісткової тканини за використання ксенологічного PRF (рис. 4.23, 4-а дослідна група) біля країв материнської кістки були сформовані тоненькі балки губчастої структури кісткової тканини з великими міжбалковими просторами. У центральній частині дефекту реєстрували невеликий об'єм ретикулофіброзної тканини. На поверхні тяжів грубоволокнистої кісткової тканини відмічали невелику кількість ядер клітин остеобластичного ряду. У порівнянні з іншими групами, об'єм сформованого остеїдного регенерату був найменшим. Подекуди візуалізувалися капіляри.

При застосуванні гранул гідроксиапатиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом та фібрину, збагаченого тромбоцитами (рис. 4.24, 5-а дослідна група), на 21-шу добу гранули композиту були щільно оточені кістковими пластинками, до

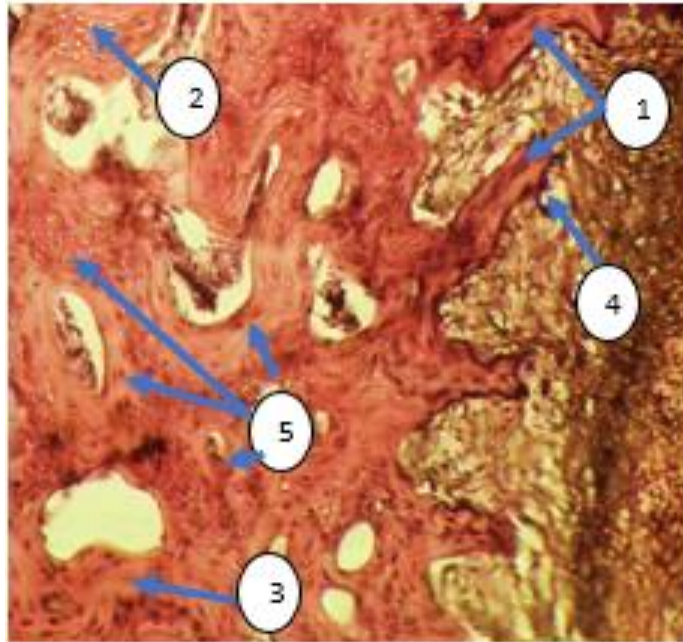


Рис. 4.21. Гістокартина фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (PRF): 1 – балки губчастої структури; 2 – ядра остеочитів замуrowаних в остеочитарні лакуни; 3 – ядра незамурованих остеочитів у остеочитарні лакуни; 4 – остеобласти на поверхні кісткових балок; 5 – молоді остеони навколо судинних каналів.

Гематоксилін і еозин, х 400

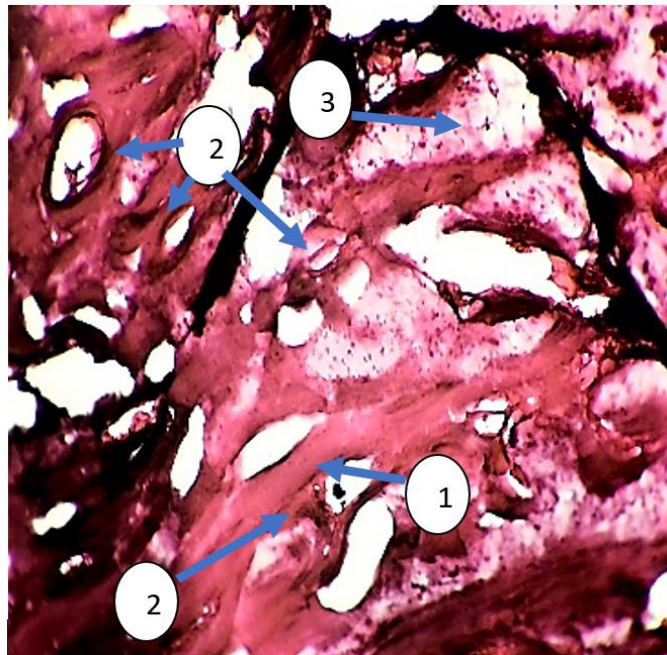
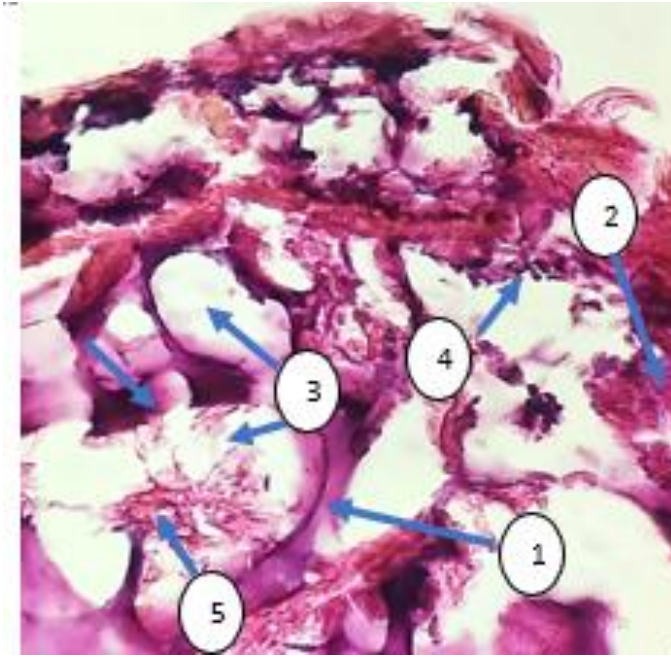


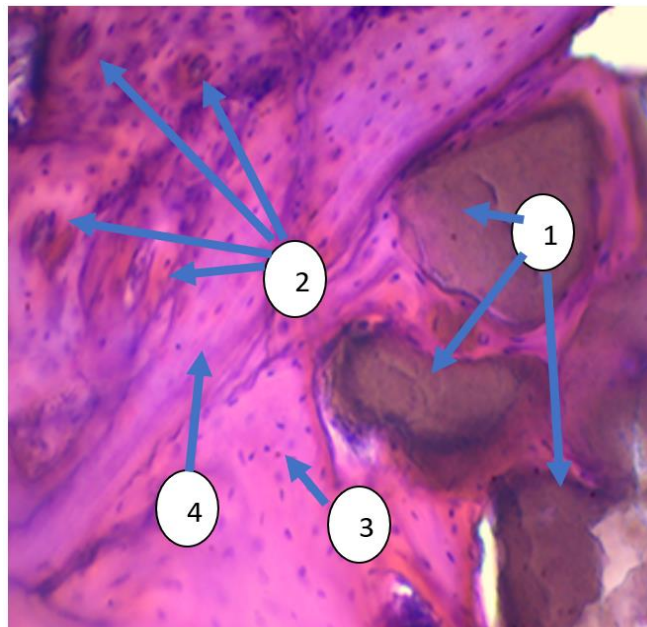
Рис. 4.22. Гістокартина фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (i-PRF): 1 – балки губчастої структури; 2 – початок формування остеонів навколо судинних каналів; 3 – міжбалковий простір. Гематоксилін і еозин, х 100



**Рис. 4.23. Гістокартина фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (ксенологічний PRF):**

1 – кісткова балка губчастого типу; 2 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 3 – міжтрабекулярні простори; 4 – ядра остеобластів; 5 – судинні канали.

Гематоксилін і еозин, х 100



**Рис. 4.24. Гістокартина фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (PRF+HA/β-TCP-700):**

1 – гранула матеріалу; 2 – формування молодих остеонів навколо судинних каналів; 3 – незамуровані остеоцити; 4 – кісткові пластинки поздовжньої локалізації.

Гематоксилін і еозин, х 400

складу яких входили незамуровані остеоцити. Подекуди відмічали ознаки резорбції гранул та утворення кісткового матриксу губчастої будови. На периферії дефекту та в центральній частині між гранулами реєстрували формування значної кількості молодих остеонів з центрально розміщеними гаверсовими каналами. Кісткові пластинки в процесі диференціації мали щільне розташування та різний напрямок.

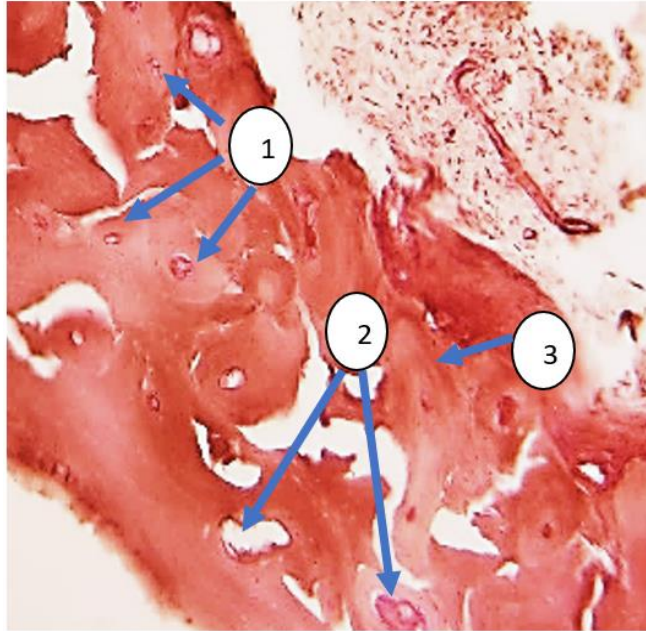
Отже, на 21-шу добу регенерація у контрольній та дослідних групах перебігала з різною інтенсивністю. Більш повноцінно та швидше остеогенез відбувався у компактній кістковій тканині 5-ї дослідної групи, що проявлялося у початку формування остеонів навіть у центральній зоні кісткового дефекту.

На 42-гу добу в контрольній групі (рис. 4.25) в ділянці дна остеони розміщувалися не рівномірно, центральна ділянка регенерату містила більш щільніше розміщені остеони. Остеоцити в кісткових пластинках не замуrowані. Процес формування остеонів навколо судинних каналів, які мали різні розміри та напрямки, характеризувався нерівномірним синтезом кісткових пластинок. На поверхні поодиноких трабекул відмічали ядра остеобластів. Біля периферії кісткова тканина мала пластинчасту структуру, а біля поверхні дефекту залишки щільної волокнистої сполучної тканини.

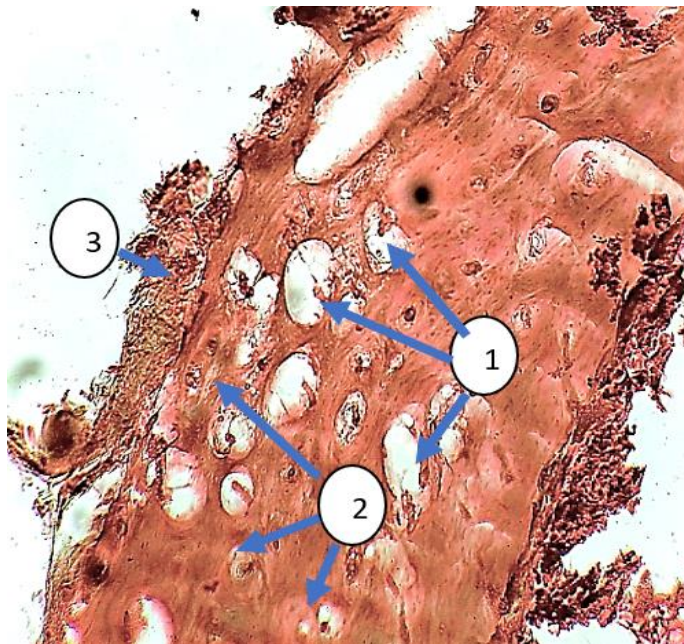
Водночас у 1-й дослідній групі кістковий регенерат (рис. 4.26) був представлений компактною речовиною кісткової тканини пластинчастої будови. Простежувались не повністю сформовані остеони, остеоцити у кісткових пластинках були незамуровані та замуrowані в остеоцитарні лакуни, а також візуалізувалися судинні канали різного діаметру. Тобто, як і у контрольній групі, ще тривали процеси ремоделювання кісткової тканини.

У випадку використання PRF (рис. 4.27, 2-а дослідна група) на 42-гу добу чітко вирізнялися доволі щільно розміщені остеони із концентрично нашарованих кісткових пластинок. Їх поверхні вкриті рядами незамурованих остеоцитів. Кількість не повністю сформованих остеонів була значно меншою, порівняно з 1-ою дослідною групою. Судинні канали мали різний діаметр.

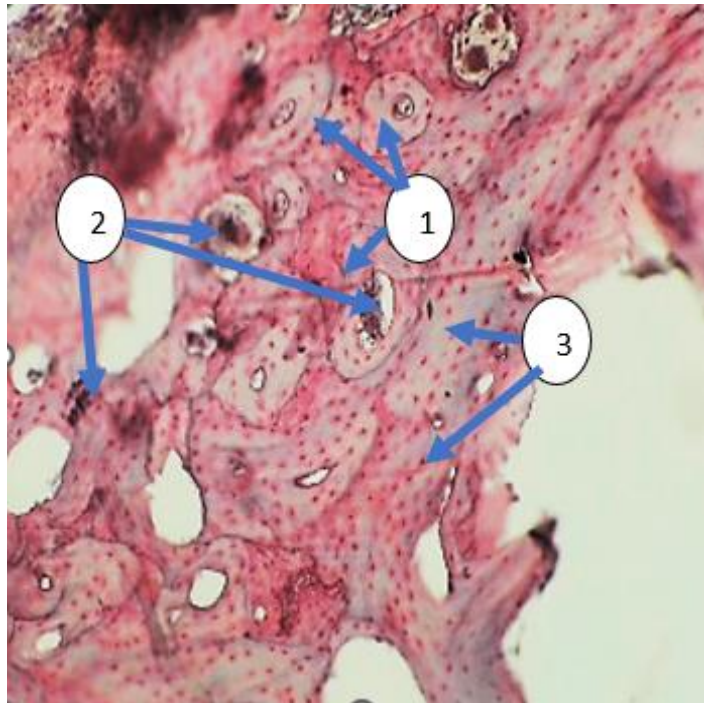




**Рис. 4.25. Гістокартина фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (контрольна група): 1 – остеони компакної речовини пластинчастої кісткової тканини із центрально розмі-щеними гаверсовими каналами; 2 – молоді остеони в стані формування; 3 – остецити незамуровані в остеоцитарні лакуни. Гематоксилін і еозин, x 100**



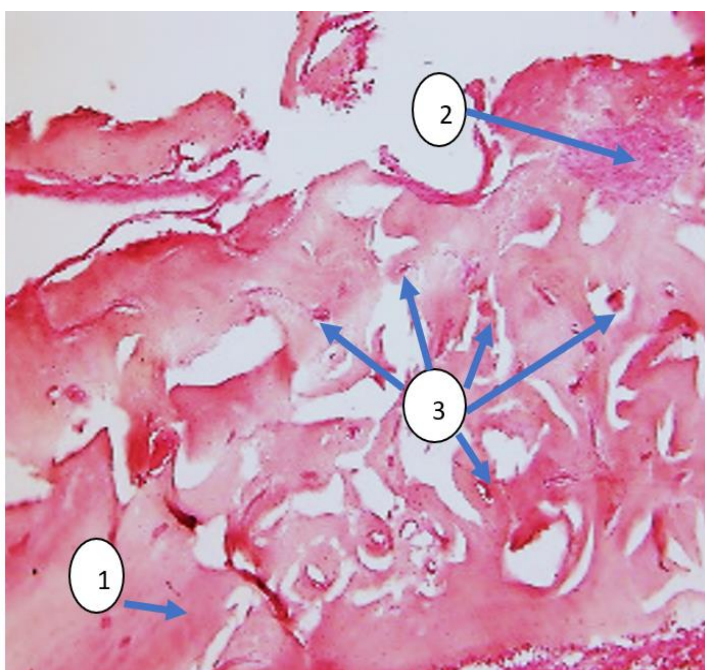
**Рис. 4.26. Гістокартина фрагментів діяфізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (PRP): 1 – розширені судинні канали; 2 – нерівномірний синтез кісткових пластинок; 3 – залишки ретикулофіброзної кісткової тканини. Гематоксилін і еозин, x 100**



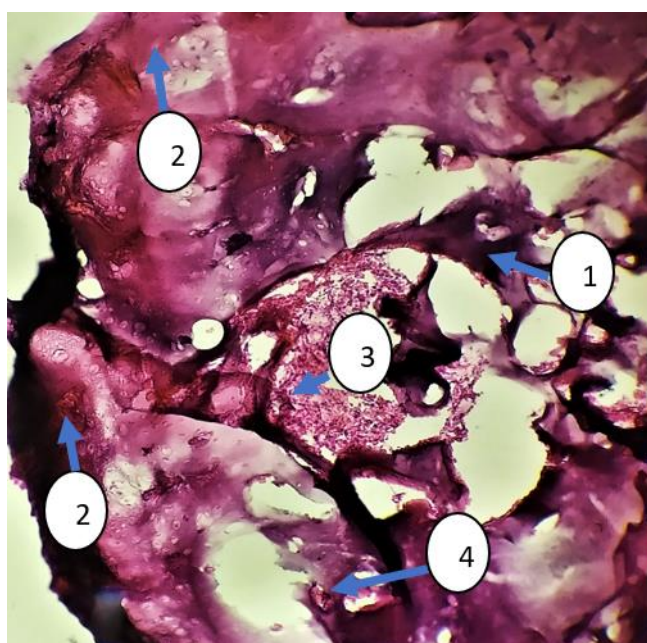
**Рис. 4.27. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (PRF):** 1 – щільно розміщені остеони компактної речовини пластинчастої кісткової тканини; 2 – судинні канали; 3 – остецити не замуровані в остеоцитарні лакуни. Гематоксилін і еозин, x 100

В цей період у 3-й дослідній групі (рис. 4.28) гістологічна картина характеризувалася продовженням формування молодих остеонів. У центральній відмічали наявність незначних осередків ретикулофіброзної тканини. Судинні канали розширені, що свідчить про сповільнені процеси репаративного остеогенезу. Тобто остеогенні процеси перебігали дещо повільніше, порівняно з 1-ю та 2-ю дослідною групою.

Водночас у 4-й дослідній групі кістковий дефект від його країв (рис. 4.29) заповнювала новоутворена кісткова тканина переважно представлена губчастою кістковою тканиною та меншою мірою зустрічалися елементи пластинчастої кісткової тканини біля материнської кістки. Невелика кількість судинних каналів. Біля поверхні дефекту значна частина регенерату була представлена хондроїдною тканиною з поодинокими розміщеними гіпертрофованими хондроцитами на периферії. Значні ділянки залишків



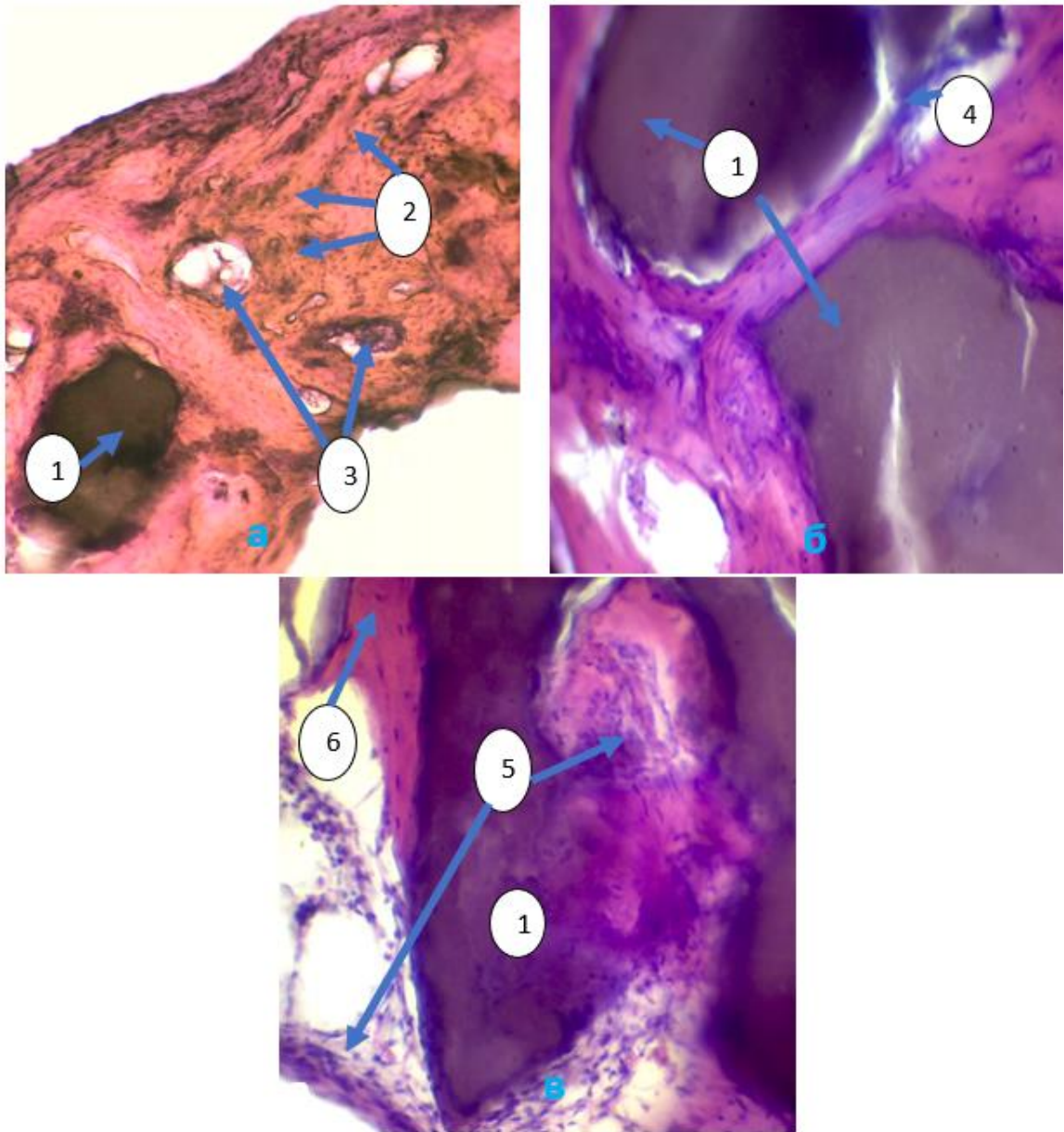
**Рис. 4.28. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (i-PRF): 1 – інтактна компактна кісткова тканина; 2 – залишки ретикулофіброзної кісткової тканини; 3 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, x 100**



**Рис. 4.29. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (ксенологічний PRF): 1 – кісткові балки губчастого типу; 2– гіпертрофовані хондроцити; 3 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 4 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, x 100**

ретикулофіброзної тканини в центральних ділянках дефекту.

В 5-й дослідній групі на 42-гу добу (рис. 4.30) на периферії кількість сформованих остеонів переважала над несформованими. Ендесмальний остеогістогенез проявлявся у вигляді скупчень ядер остеобластів навколо гранул керамічного матеріалу. Відбувалося вrostання грубоволокнистої



**Рис. 4.30. Гістокартина фрагментів діафізів променевих кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700): 1 – гранула матеріалу; 2 – сформовані остеони з центрально розміщеними гаверсовими каналами; 3 – судинні канали; 4 – скупчення ядер остеобластів навколо гранул; 5 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 6 – остецити незамуровані в остеоцитарні лакуни. Гематоксилін і еозин, а х 100, б, в х 400**

кісткової тканини в середні та глибокі шари композиту. Спостерігалися виражені процеси руйнування гранул.

Тобто, на 42-гу добу за ступенем зрілості кісткового регенерату у компактній кістковій тканині, кальцій-фосфатна кераміка в комбінації з фібрином, збагаченим тромбоцитами, найбільш виражено оптимізує репаративний остеогенез.

Отже, у компактній речовині кісткової тканини гістоморфологічна картина в контрольній і дослідних групах у різні терміни репаративного остеогенезу характеризувалася початком формування остеоїду від периферії до центральної частини дефекту, окрім 5-ї дослідної групи, оскільки в ній мало місце раннє утворення осередків ретикулофіброзної кісткової тканини і в центральних зонах.

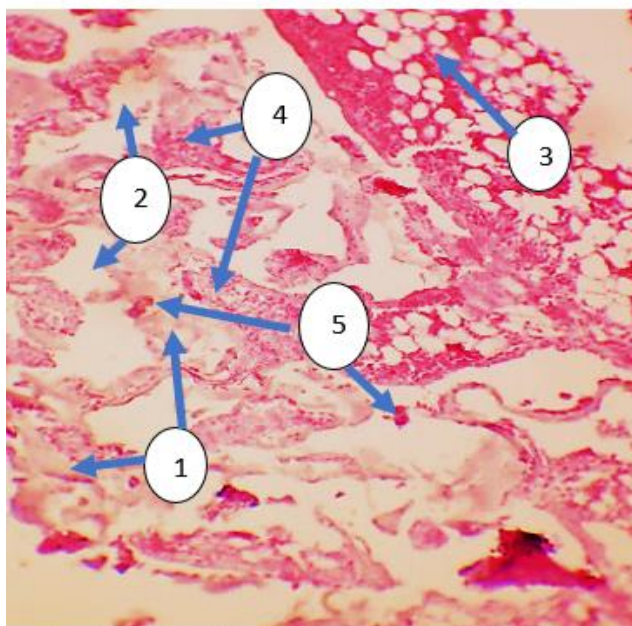
Встановлено, що, порівняно з контрольною і 1-ю, 2-ю, 3-ю дослідними групами, репаративний остеогенез у 4-й дослідній групі перебігав помітно повільніше. І навпаки – більш інтенсивно у 5-й дослідній групі за остеозаміщення PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700, про що свідчила вже з 14-ї доби присутність у зрізах кісткової тканини капілярів у новоутвореному регенераті, на відміну від інших груп.

У 1-й, 2-й та 3-й і 5-й дослідних групах більша щільність клітин та товщина кісткових балок порівняно з контрольною може свідчити про активний вплив факторів росту, які містяться у  $\alpha$ -гранулах тромбоцитів на процеси клітинної міграції, диференціації і проліферації.

Тобто, у компактній кістковій речовині остеозаміщення PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700 сприяє більш швидкому перебігу репаративного остеогенезу та його оптимізації.

Гістологічна картина репаративного остеогенезу в губчастій кістковій речовині кісткової тканини кролів була наступною. На його 14-ту добу зразки кісткової тканини у тварин контрольної групи (рис 4.31) характеризувалися наявністю ретикулофіброзної кісткової тканини, що виповнювала дефект з периферії країв материнської кістки до його центральних ділянок. Між ними

подекуди реєстрували осередки кісткового мозку. Відмічали помірну щільність клітин фібробластичного ряду в регенераті та остеобластичного ряду у товщі тяжів грубоволокнистої кістки та на їх поверхні.



**Рис. 4. 31. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (контрольна група): 1 – кісткові балки губчастого типу; 2 – міжтрабекулярні простори; 3 – кістковий мозок; 4 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 5 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, х 100**

У випадку 1-ї дослідної групи (рис. 4.32, PRP) ближче до поверхні дефекту розміщувалися пучки волокнистого комплексу, що мали значний об'єм. В його товщі візуалізувалися ядра клітин фібробластичного ряду. У ділянці дна дефекту відмічали осередки ретикулофіброзної тканини та початок формування трабекул губчастої речовини пластинчастої кісткової тканини. Тобто відмічали репаративний остеогенез переважно за рахунок ендосту. Порівняно з контрольною групою, у 1-й дослідній відмічали більш інтенсивніше формування молоді незрілої кісткової тканини.

За використання PRF (рис. 4.33, 2-а дослідна група) регенерат заповнював ділянку дефекту губчастої кістки більш однорідним масивом комплексу волокнистих структур з великою щільністю ядер малодиферен-

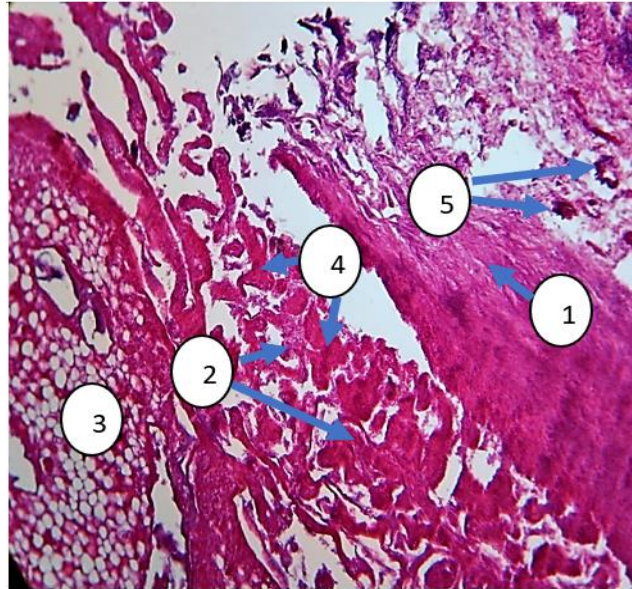


Рис. 4.32. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (PRP): 1 – пучки волокнистого комплексу; 2 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 3 – кістковий мозок; 4 – трабекули губчастої речовини пластинчастої кісткової тканини; 5 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, х 100

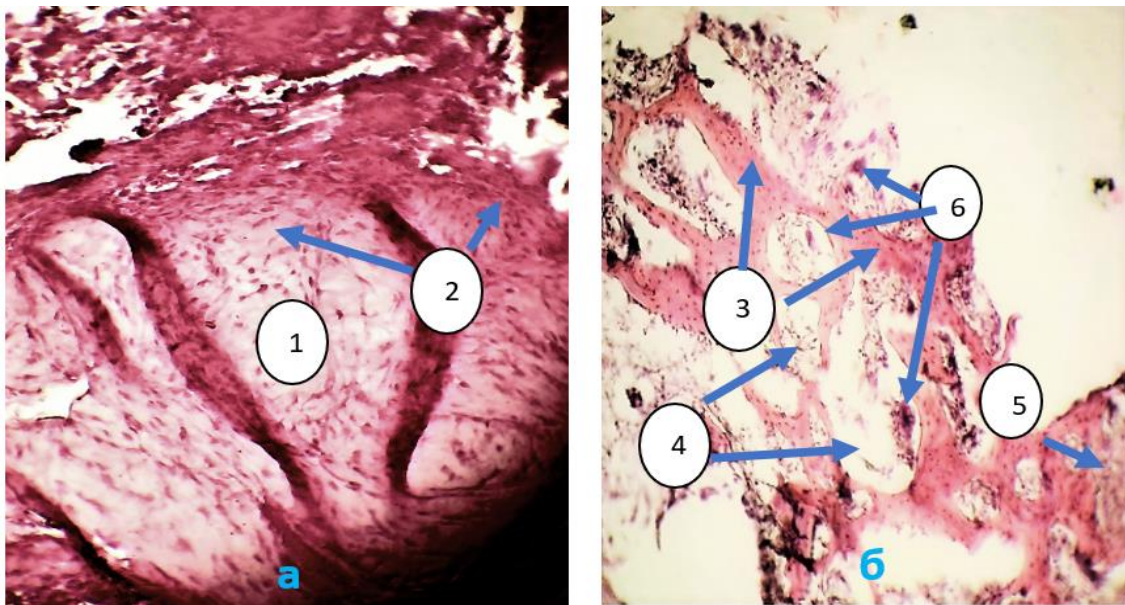


Рис. 4.33. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (PRF): 1 – пучки колагенового комплексу; 2 – ядра клітин фібробластичного та остебластичного рядів; 3 – кісткові балки губчастого типу; 4 – міжтрабекулярні простори; 5 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 6 – судини. Гематоксилін і еозин, а х 400, б х 100

ційованих клітин у центральній частині (рис. 4.33, а), а у ділянці контакту з материнською кісткою (рис. 4.33, б) були сформувані трабекули губчастої будови в процесі формування, на поверхні яких реєстрували ряди ядер остеобластів. Міжбалкові простори були значних розмірів. Тобто, відмічали більш інтенсивний остеогенез за заміщення дефектів PRF.

У 3-й дослідній групі (рис 4.34, і-PRF) регенерат мав також, як і в групі PRF, волокнисту структуру, проте біля материнської кістки реєстрували невеличкі осередки ретикулофіброзної кісткової тканини, порівняно з 2-ю групою. Волокнистий регенерат у центральній частині мав досить високу щільність ядер клітин.

Натомість у 4-й дослідній групі на 14-ту добу (рис. 4.35, ксенологічний PRF) материнська кістка контактувала з оксифільною масою, слабо інфільтрованою клітинними елементами. Візуалізувалася невелика кількість ядер клітин фібробластичного ряду (рис. 4.35, б). Водночас на межі із сформованим дефектом кісткова тканина і регенерат були інтенсивно інфільтровані малодиференційованими клітинами. Спостерігали наявність демаркаційної лінії в сформовану лейкоцитами. Тобто, на відміну від інших груп процеси остеогенезу протікали доволі слабо та проявлялися формуванням демаркаційної лінії на межі кісткового дефекту.

У 5-й дослідній групі (рис. 4.36, PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700) на 14-ту добу в губчастій кістці місце дефекту на межі з материнською кісткою було заповнене великою кількістю волокон з масивом веретеноподібних та малодиференційованих клітин грубоволокнистої кісткової тканини. Також островково формувалися кісткові балки у незначній кількості, які зосереджувалися навколо гранул композиту зокрема на їх поверхні, щільно прилягаючи у вигляді тонкої смужки. Між гранулами, як і у зразках інших груп, відмічали присутність елементів кісткового мозку, у тому числі жирових клітин, які мають енергетичний потенціал.

Отже, на 14-ту добу у губчастій кістковій тканині процеси остеогенезу найбільш повільно розвивалися в групі з використанням ксенологічного PRF,



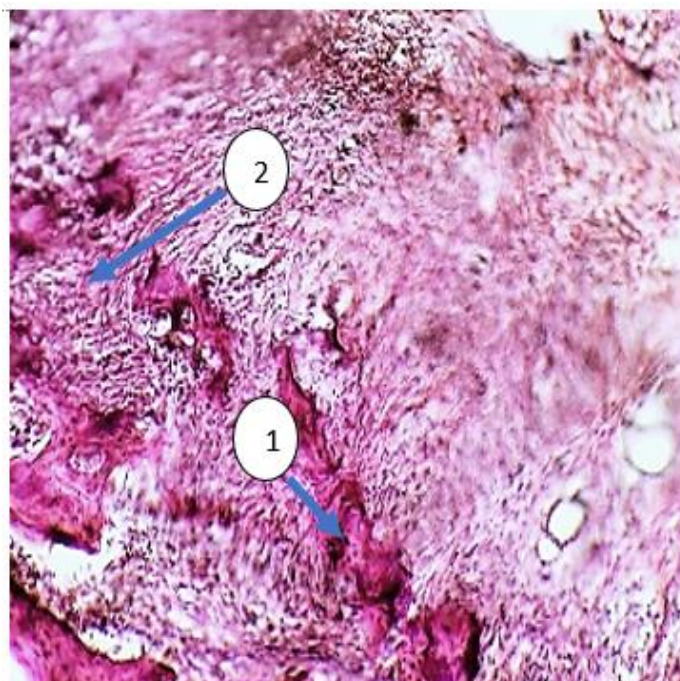


Рис. 4.34. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (i-PRF): 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 2 – волокнистий регенерат з ядрами малодиференційованих клітин. Гематоксилін і еозин, x 100

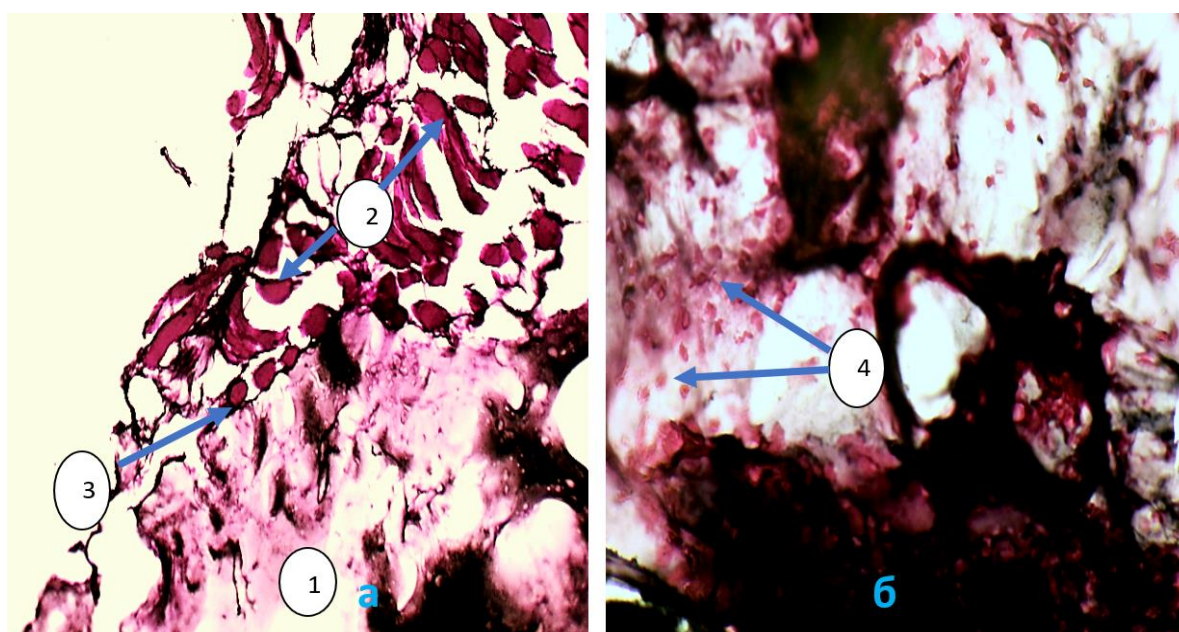


Рис. 4.35. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (ксенологічний PRF): 1 – материнська кістка; 2 – фрагменти ксенологічного фібрину; 3 – фрагменти демаркаційної лінії; 4 – ядра клітин фібробластичного ряду. Гематоксилін і еозин, а – x 100, б – x 1000

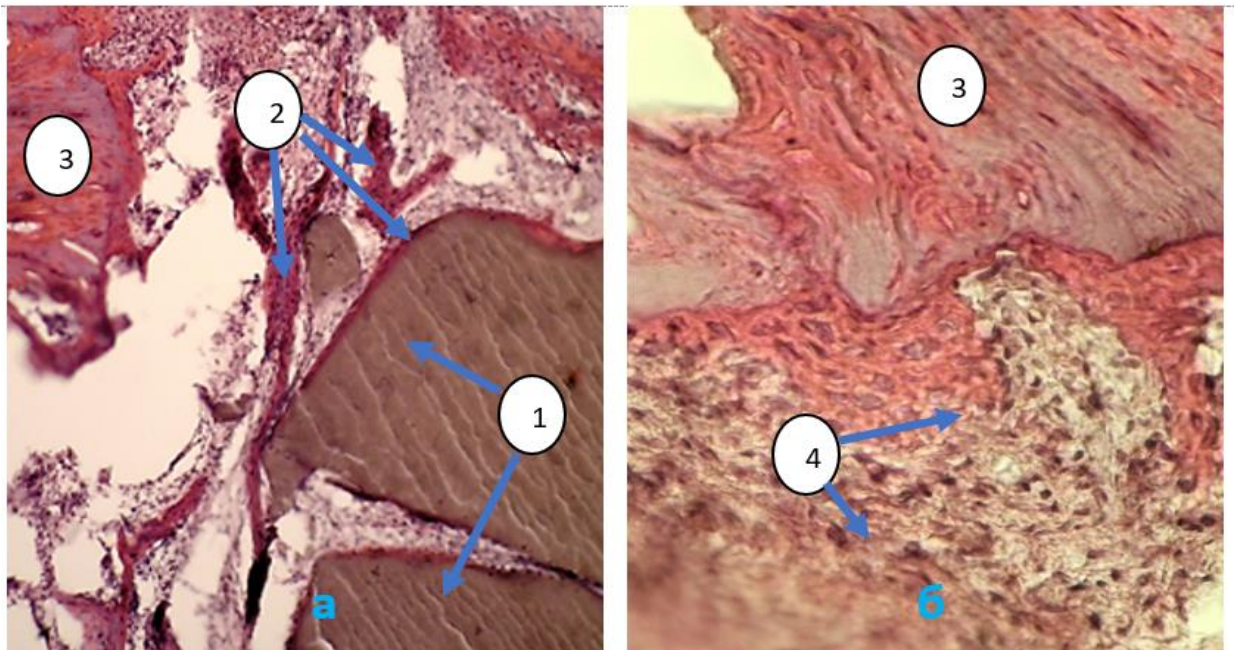


Рис. 4.36. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великого-мількових кісток кролів на 14-ту добу репаративного остеогенезу (PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700): 1 – гранула матеріалу; 2 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 3 – інтактна губчаста кісткова тканина; 4 – ядра веретеноподібних і малодиференційованих клітин. Гематоксилін і еозин, а x 100, б, в x 1000

оскільки навіть біля материнської кістки не виникало формування грубоволокнистої кісткової тканини, та найінтенсивніше протікали за остеозаміщення PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700. Про це свідчить формування тяжів грубоволокнистої кістки не лише на периферії, а і в центральній зоні кісткового дефекту навколо гранул композитного матеріалу.

Подальші гістоморфологічні дослідження засвідчили, що на 21-шу добу в контрольній групі (рис. 4.37) в центральній частині дефектів губчастої речовини візуалізувалася ретикулофіброзна кісткова тканина, інфільтрована остеогенними елементами. Також відмічали утворення капілярів, розширених та наповнених еритроцитами. Поряд локалізувалися новоутворені кісткові балки у товщі яких відмічали невелику кількість замуrowаних остеоцитів та певна кількість ядер активних остеобластів, розташованих на поверхні. Міжтрабекулярні простори заповнені кістковим мозком, візуалізувалися ліпоцити.

Водночас у 1-й дослідній групі (рис. 4.38, PRP) подібні процеси розвивалися більш інтенсивно, про що свідчила кількість та об'єм новоутворених трабекул губчастої будови за рахунок більшої кількості остеобластів і незамурованих остеоцитів.

У зразках препаратів 2-ї дослідної групи (рис. 4.39, а, PRF) на 21-шу добу в місці дефекту виявили все ще значну кількість ретикулофіброзної кісткової тканини, яка локалізована поряд з трабекулами. Поряд зі значною щільністю клітинних елементів – малодиференційовані клітини, остеоцити та остеобласти. Встановлена велика кількість дрібних судин, наповнених еритроцитами (рис. 4.39, б). Також відмічали наявність рядів ядер активних остеобластів, які вкривали поверхні ендостальних кісткових балок, а їх ядра були суттєво більшими за розміром, порівняно з попередньою групою. В остеоцитарних лакунах знаходилася значна кількість новоутворених остеоцитів. Ендостальні регенерати в процесі утворення наближалися на зустріч один одному, заповнюючи дефект. На периферії сформовані кісткові балки поступово піддавались органотиповій перебудові – набували пластинчастої структури. Товщина їх, а також кількість дрібних судин, були більшими у порівнянні з групою контролю та 1-ю дослідною.

В цей же період у групі і-PRF (рис. 4. 40, 3-я дослідна) візуалізувалися балки губчастої речовини кісткової тканини, що мали невелику товщину в ділянці контакту з материнською кісткою. Їх об'єм був значно більшим, порівняно з попередньою групою. Формування губчастої структури та міжбалкових просторів реєстрували у меншій мірі. В центральних ділянках дефекту значний об'єм ретикулофіброзної тканини, яка не рівномірно розміщувалася у ділянці контакту з тканиною червоного кісткового мозку. Реєстрували значну кількість судинних каналів, що знаходилися у ретикулофіброзній тканині. У товщі балок та на їх поверхні розміщувалась помірна кількість ядер клітин остеобластичного ряду. Тобто відмічали помірний перебіг стадій репаративного остеогенезу.

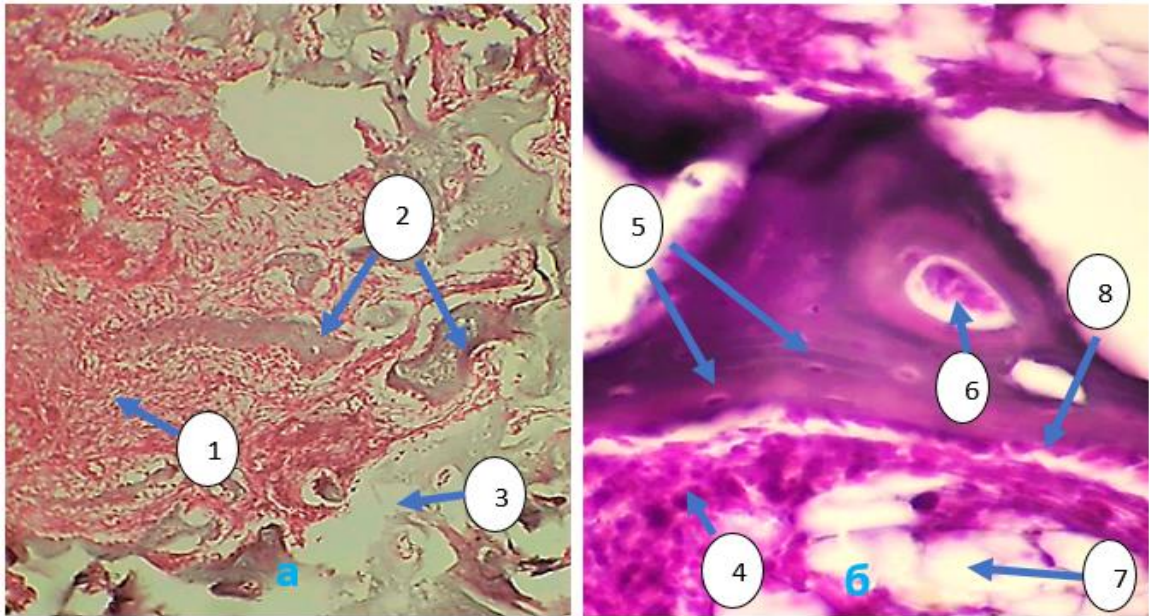


Рис. 4.37. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великого-мількових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (конт-рольна група): 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина; 2 – кісткові балки; 3 – пластинчаста кісткова тканина губчастої речовини; 4 – міжтрабекулярні простори з червоним кістковим мозком; 5 – остецити; 6 – судинний канал; 7 – ліпоцити; 8 – ядра активних остеобластів.

Гематоксилін і еозин, а – х 100; б – х 400

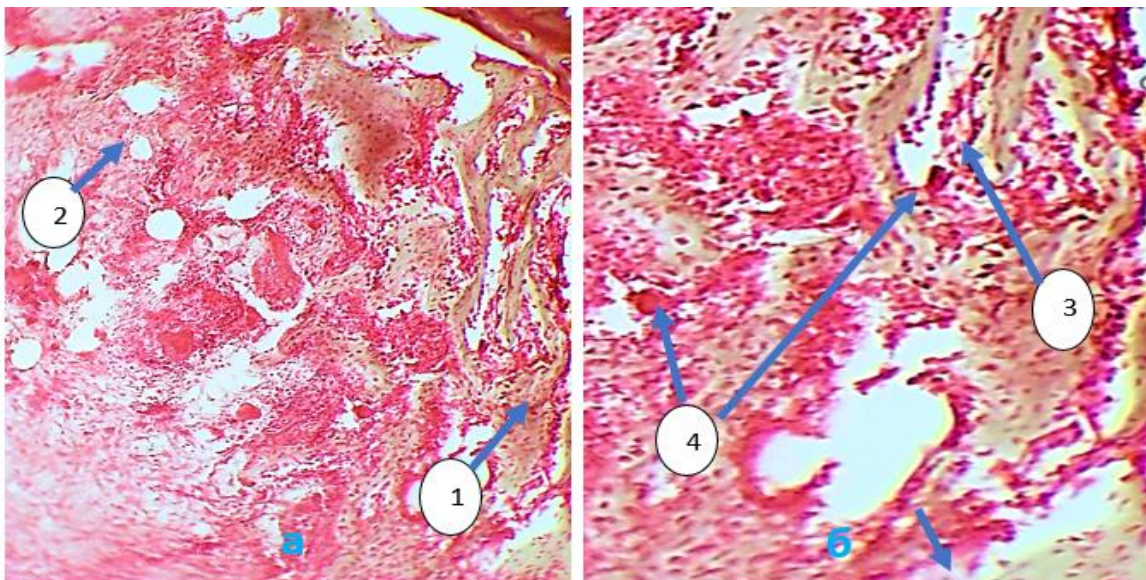


Рис. 4.38. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великого-мількових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (PRP): 1 – кісткові балки губчастого типу; 2 – ретикулофіброзна тканина; 3 – міжтрабекулярні простори, заповнені кістковим мозком; 4 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, а – х 100, б – х 400

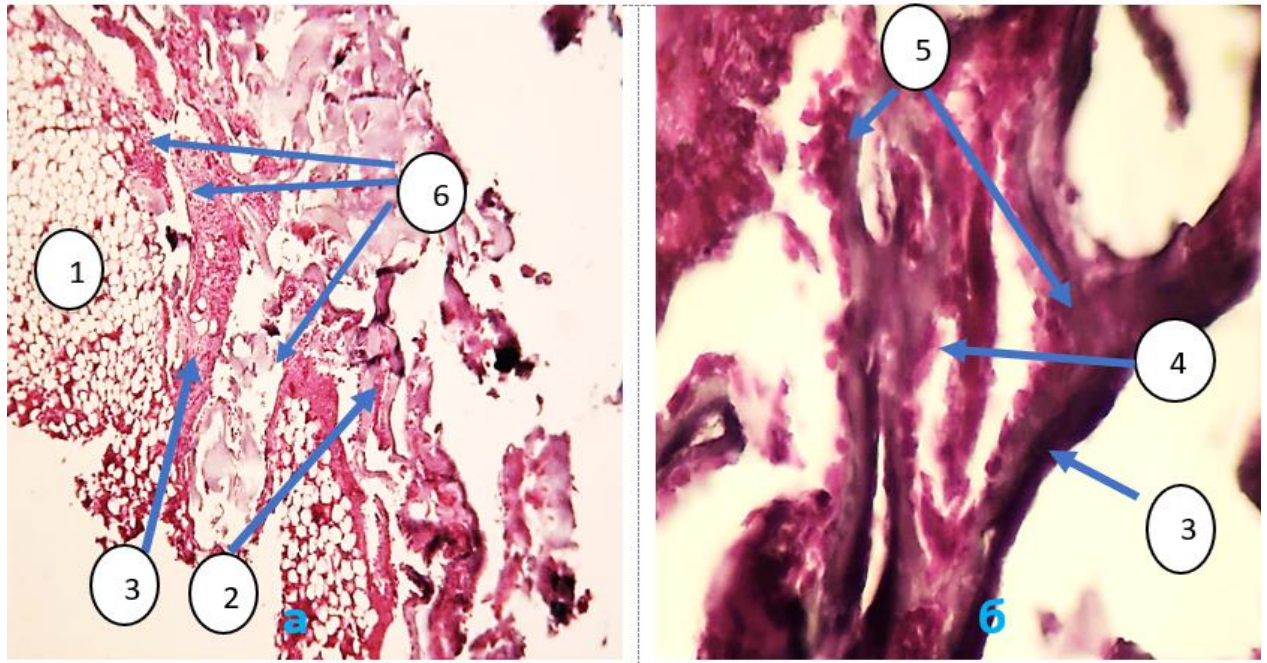


Рис. 4.39. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогоміл-кових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (PRF): 1 – кістковий мозок; 2 – ретикулофіброзна тканина; 3 – балки губчастого типу; 4 – замуровані остецити; 5 – активні остеобласти на поверхні балок; 6 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, а – х 100, б – х 400

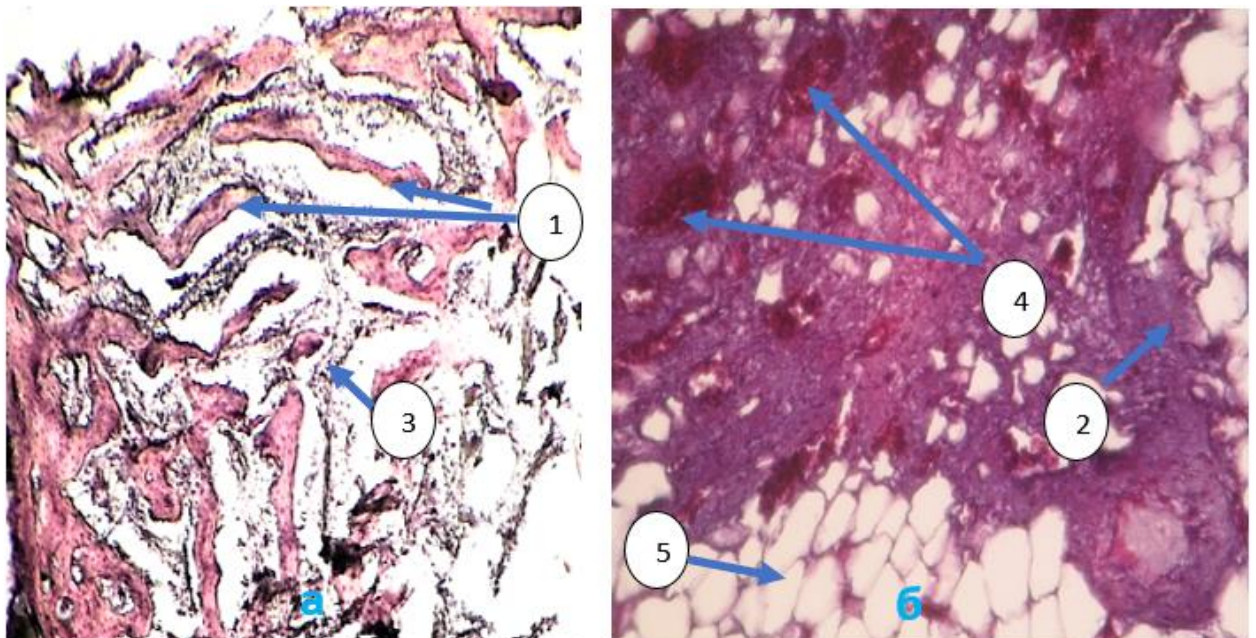


Рис. 4.40. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогоміл-кових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (i-PRF): 1 – балки губчастого типу; 2 – грубоволокниста кісткова тканина; 3 – міжбалкові простори, заповнені кістковим мозком; 4 – судини; 5 – ліпоцити. Гематоксилін і еозин, а х 100, б х 400

За використання ксенологічного PRF (рис. 4.41, 4-а дослідна група) центральна ділянка дефекта, а також один з країв материнської кістки були заповнені хондроїдом з початком його осифікації на периферії у місці контакту з материнською кісткою. В цій ділянці подекуди формувалася ретикулофіброзна кісткова тканина. Візуалізувалися групи клітин фібробластичного ряду. Щільність клітин була доволі низькою (рис. 4.41, б) контакт регенерату з краями дефекту був нерівномірний, а у деяких місцях відсутній, що підтверджувало макроморфологічні дослідження. Тобто

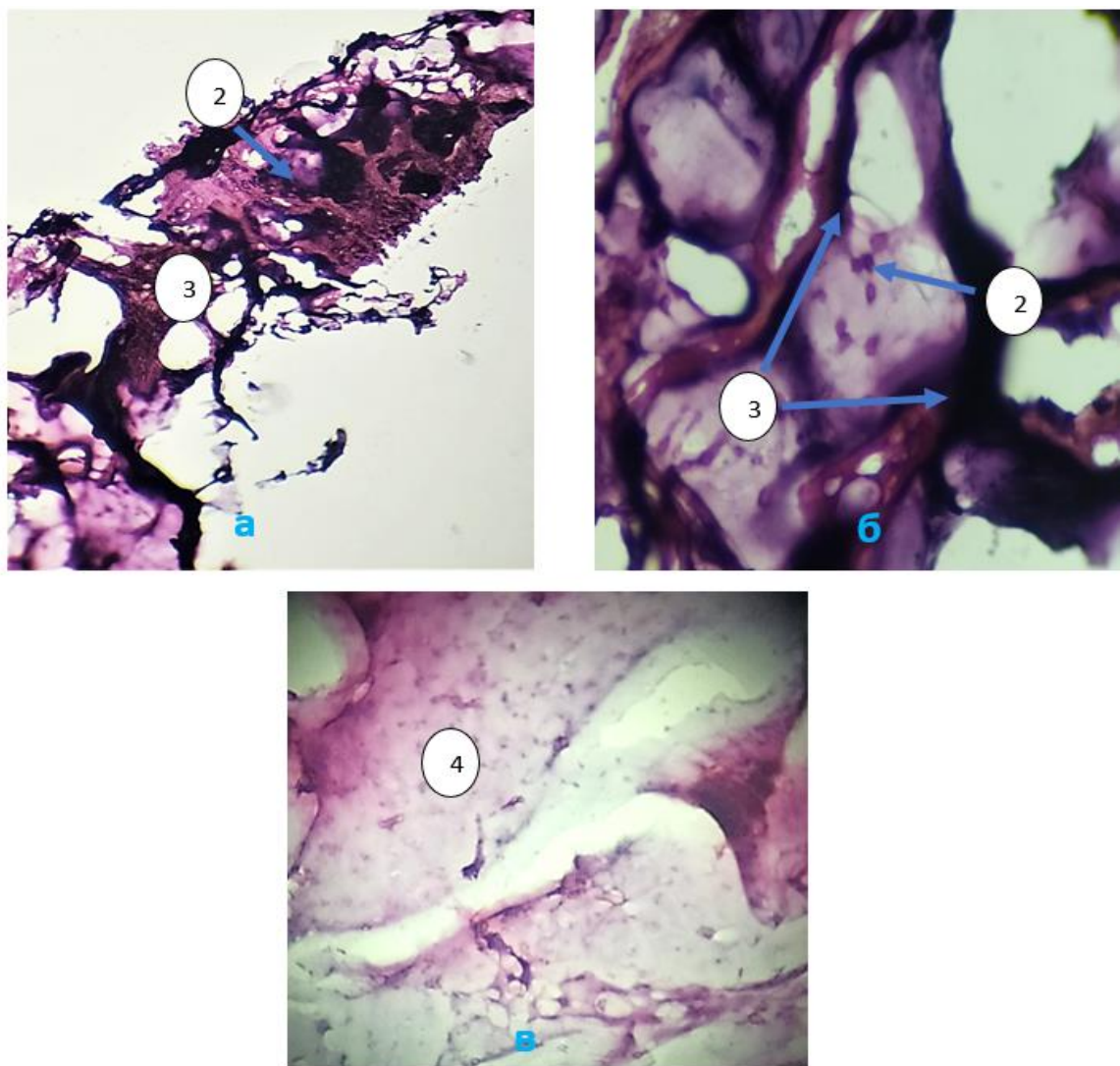
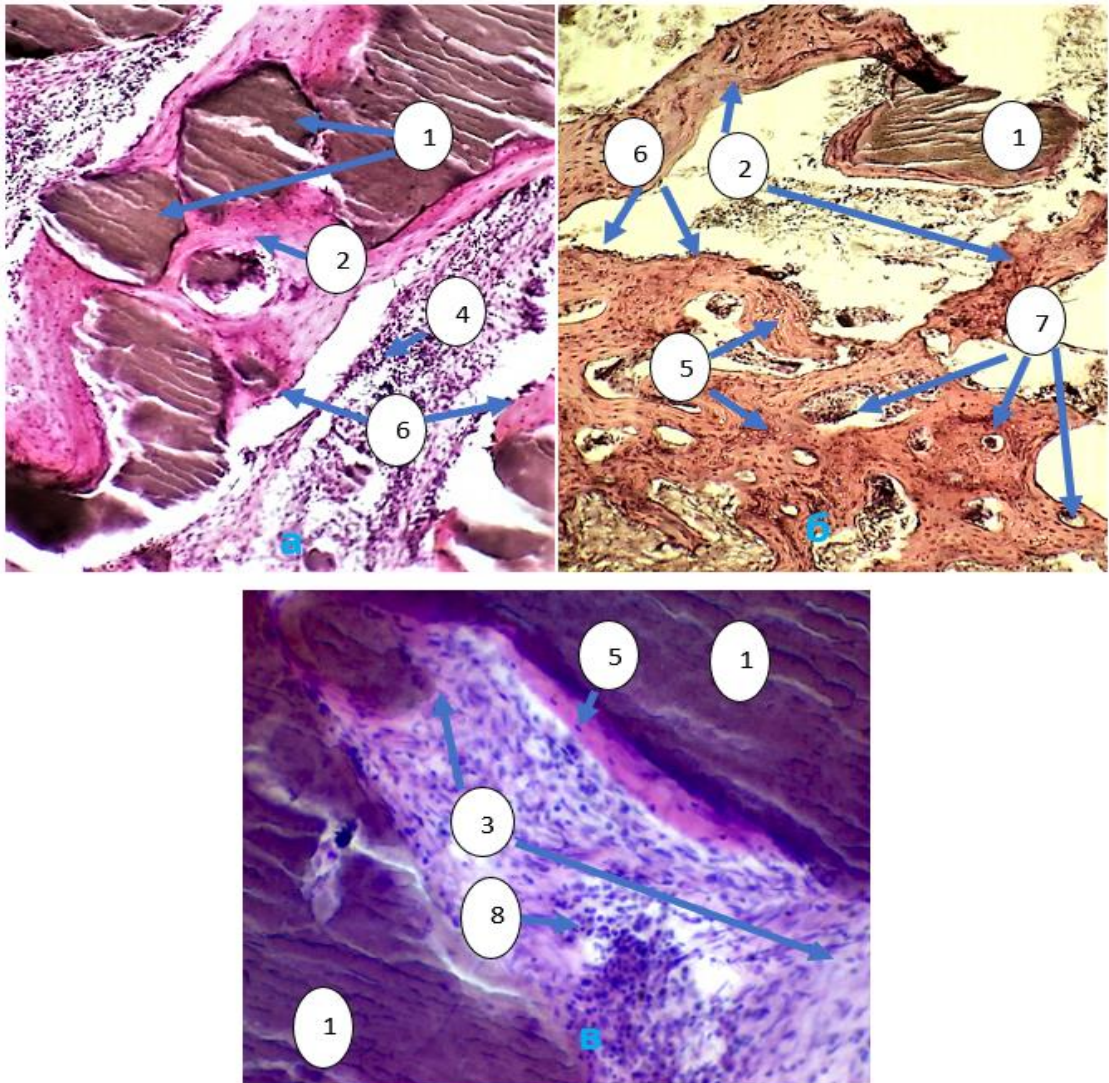


Рис. 4.41. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 21-шу добу репаративного остеогенезу (ксенологічний PRF): 1 – материнська кістка; 2 – ядра клітин фібробластичного ряду; 3 – залишки ксенологічного PRF; 4 – хондроїд. Гематоксилін і еозин, а x 100, б, в x 400

кісткова регенерація відбувалася із затримкою, у порівнянні з контрольною та іншими дослідними групами.

Водночас, на 21-шу добу в 5-й дослідній групі (рис. 4.42, PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700) товщина кісткових балок значно збільшилася, порівняно з попереднім терміном. Губчаста речовина пластинчастої кісткової тканини була побудована балками, за тісного контакту із гранулами гідроксиапатиту



**Рис. 4.42. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів 21-шу добу репаративного остеогенезу (PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700): 1 – гранула композитного матеріалу; 2 – губчаста кісткова тканина; 3 – смужки ретикулофіброзної тканини; 4 – кістковий мозок; 5 – ядра замуrowаних остеоцитів; 6 – ядра активних остеобластів на поверхні трабекул; 7 – судинні канали; 8 – ядра малодиференційованих клітин остеобластичного ряду в ретикулофіброзній кістковій тканині.**  
Гематоксилін і еозин, а, б х 400, в х 1000

з  $\beta$ -трикальційфосфатом. В товщі балок в лакунах візуалізувалися значна кількість незамурованих остеоцитів, по краю трабекул – ряди ядер остеобластів. Відбувалося вrostання як грубоволокнистої кісткової тканини з ядрами малодиференційованих клітин остеобластичного ряду, так і частково губчастої речовини кісткової тканини, в поверхневі шари композиту при цьому реєстрували ядра малодиференційованих клітин остеобластичного ряду в ретикулофіброзній кістковій тканині. Новоутворений регенерат однорідно та повністю заповнював кістковий дефект. У міжтрабекулярному просторі розміщувався червоний кістковий мозок (рис. 4.42, б) та велика кількість судинних каналів.

Отже, на 21-шу добу в губчастій кістковій тканині регенерація перебігала більш повноцінніше та швидше в 5-й дослідній групі, про що свідчили значна щільність ядер клітин остеобластичного ряду, товщина кісткових балок та їх об'єм, який заповнював місце дефекту.

Гістоморфологічні дослідження на 42-гу добу засвідчили, що в зразках контрольної групи (рис. 4.43) в ділянці контакту з материнською кісткою дефект майже повністю заповнений губчастою речовиною пластинчастої кісткової тканини, трабекули мали помірну товщину. В центральній частині трабекул спостерігалися чисельні незамуровані остеоцити. Міжтрабекулярні простори були заповнені ретикулярною тканиною та містили клітини червоного кісткового мозку. На поверхні дефекту та в ділянці кістково-мозкової порожнини ще тривали процеси остеогістогенезу, про це свідчила наявність рядів ядер остеобластів на поверхні кісткових балок.

У групі PRP (рис. 4.44, 1-а дослідна) дефект у центральній ділянці також був заповнений не повною мірою трабекулами губчастої речовини пластинчастої кісткової тканини. Проте вони мали невелику товщину, а їх кількість була незначною, натомість міжбалкові простори були досить великого розміру заповнені кістковим мозком. На поверхнях трабекул реєстрували ряди ядер остеобластів, як і у контрольній групі, але у невеликій



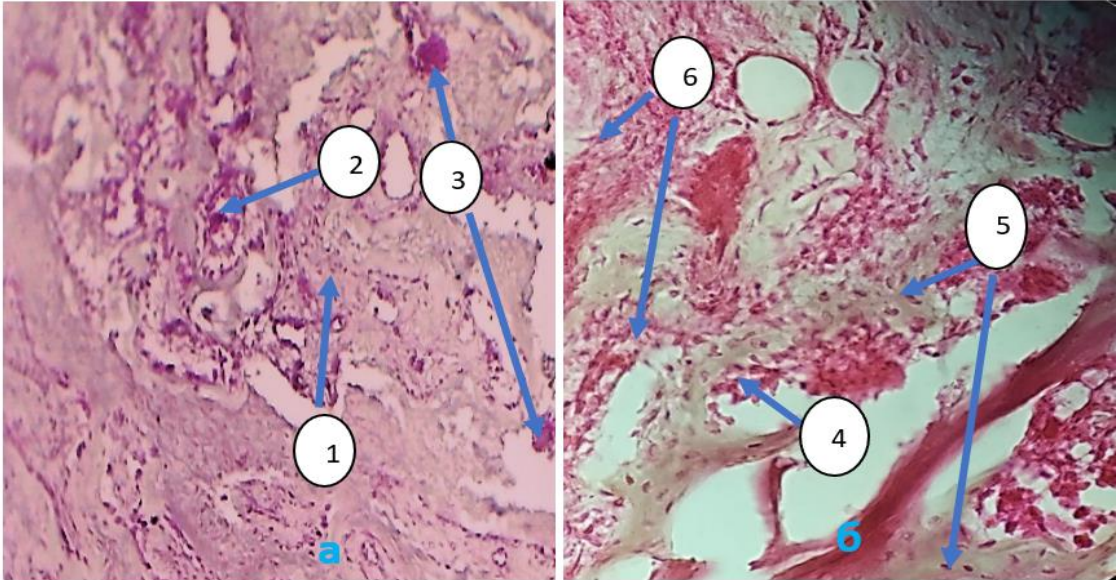


Рис. 4.43. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (контрольна група): 1 – губчаста речовина пластинчастої кісткової тканини; 2 – міжтрабекулярні простори, що містять кістковий мозок; 3 – судинні канали; 4 – ряди ядер остеобластів; 5 – незамуровані остеоцити; 6 – ретикулофіброзна тканина. Гематоксилін і еозин, а x 100, б x 400

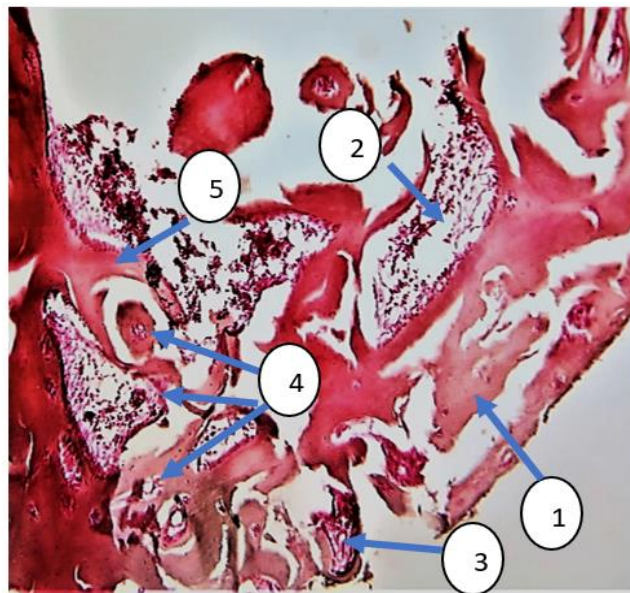


Рис. 4.44. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (PRP): 1 – пластинчаста кісткова тканина губчастої будови; 2 – міжтрабекулярні простори з ретикулярною тканиною і клітинами кісткового мозку; 3 – залишки ретикулофіброзної кісткової тканини; 4 – судини і судинні канали; 5 – кісткові трабекули. Гематоксилін і еозин, x 100

кількості. Поряд з частково сформованими трабекулами губчастої речовини відмічали острівці ретикулофіброзної тканини.

На 42-гу добу в 2-й дослідній групі (рис. 4.45, PRF) дефект був повністю заміщений трабекулами губчастої речовини пластинчастої кісткової тканини з судинними каналами різного діаметру. Трабекули мали доволі щільне розташування, на відміну від попередніх груп. В їх товщі простежувались остеоцитарні лакуни з переважно замуrowаними та незначною кількістю замуrowаних остеоцитів, а також невеликі ділянки ретикулофіброзної кісткової тканини між балками, як свідчення продовження процесів остеогенезу у центральній зоні модельованого дефекту.

В цей же період у зразках 3-ї дослідної групи (рис. 4.46, i-PRF) у кістковому дефекті картина була подібною до 2-ї дослідної групи, проте, осередки ретикулофіброзної кісткової тканини між балками займали дещо більший об'єм і розміщувалися як у центральній зоні, так і в деяких місцях на периферії. Тобто, процеси остеобластичної диференціації ще тривали, щільність ядер остеобластичних клітин була помірною. Натомість, регенеровані трабекули губчастої речовини мали значну товщину та об'єм. В середині балок відмічали незначну кількість замуrowаних остеоцитів у остеоцитарні лакуни.

Водночас, за використання ксенологічного PRF (рис. 4.47, 4-а дослідна група) між балками губчастої речовини, зокрема, у центральній частині дефекту простежувалися значні ділянки гіалінової хрящової тканини, чого в інших групах не відмічали, що свідчить про загальмовані процеси репаративної регенерації. Реєстрували в острівцях гіалінової хрящової тканини поодинокі гіпертрофовані хондроцити.

На 42-гу добу в 5-й дослідній групі (рис. 4.48, PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700) гранули керамічного композиту, які були в стані вираженої деструкції: округлі конгломерати або їх фрагменти неправильної форми. Місцями вони оточені незначними ділянками грубоволокнистої кісткової тканини, яка щільно прилягала до їх поверхні. Основна частина регенерату утворена

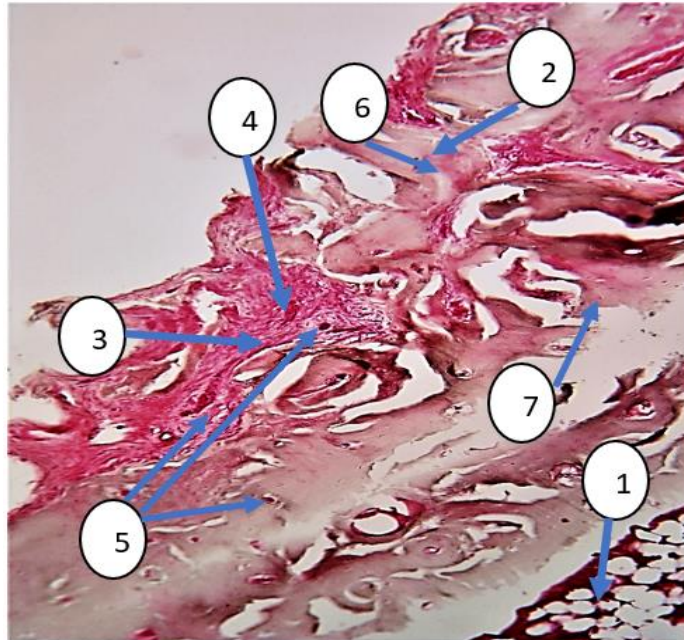


Рис. 4.45. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (PRF): 1 – кістковий мозок; 2 – балки губчастої будови; 3 – ядра малодиференційованих клітин остеобластичного ряду; 4 – залишки ретикулофіброзної кісткової тканини між балками; 5 – судинні канали; 6 – незамуровані остеоцити; 7 – замуровані остеоцити. Гематоксилін і еозин, x 100

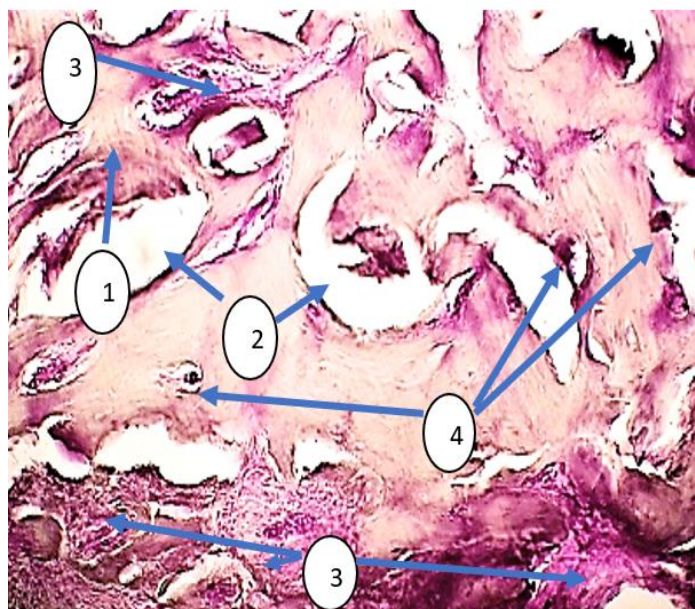


Рис. 4.46. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великогомілкових кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (i-PRF): 1 – губчаста речовина пластинчастої кісткової тканини; 2 – міжтрабекулярні простори; 3 – залишки ретикулофіброзної кісткової тканини між балками; 4 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, x 100

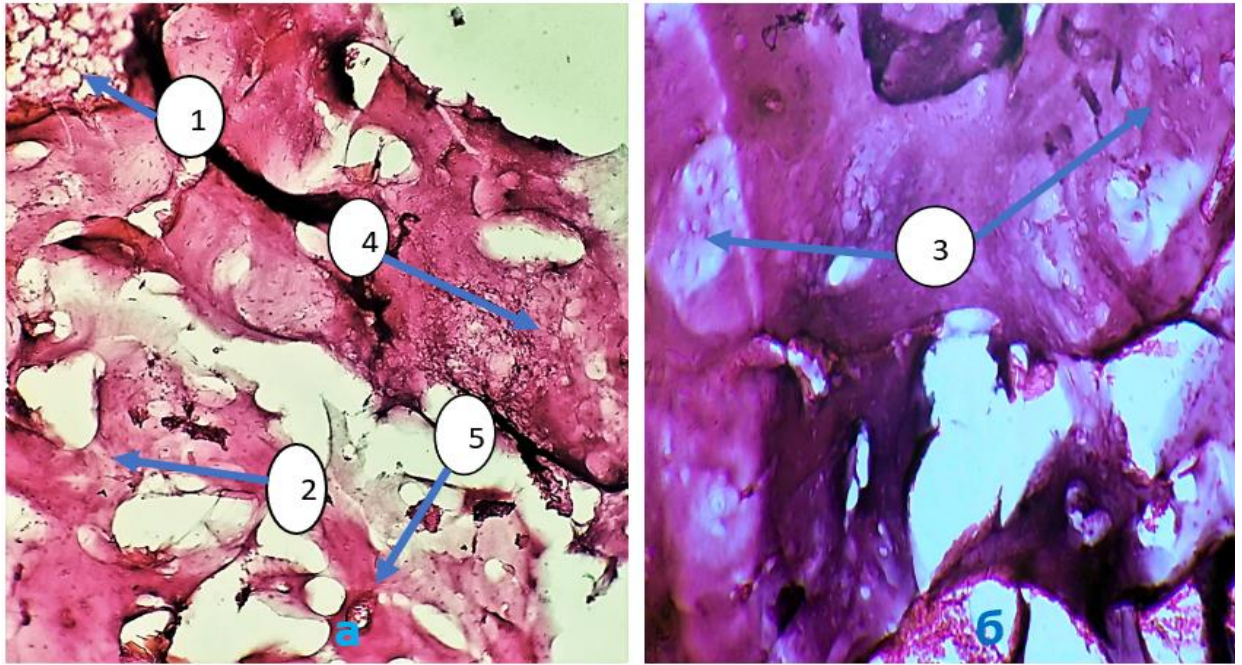


Рис. 4.47. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великого-м'яких кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (ксенологічний PRF): 1 – кістковий мозок; 2 – кісткові балки губчастого типу; 3 – гіпертрофовані хондроцити ; 4 – гіаліновий хрящ; 5 – судинні канали. Гематоксилін і еозин, а x 100, б x 400

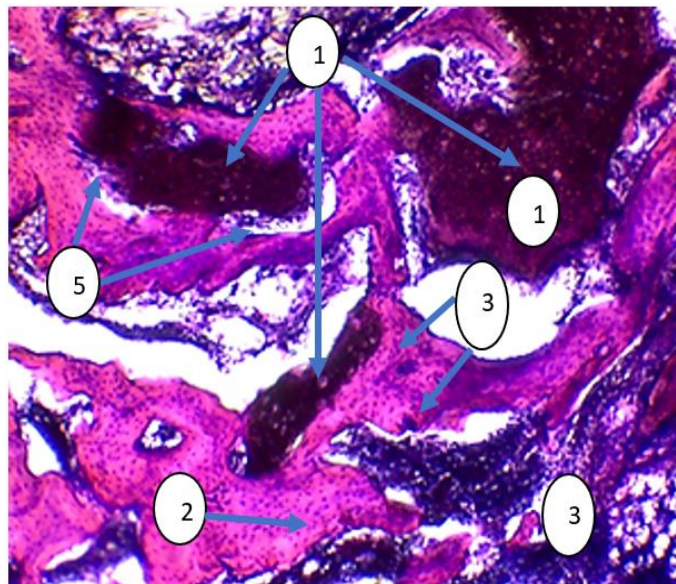


Рис. 4.48. Гістокартина фрагментів проксимальних епіфізів великого-м'яких кісток кролів на 42-гу добу репаративного остеогенезу (PRF+ HA/β-TCP-700): 1 – гранула композитного матеріалу; 2 – трабекули губчастої кісткової тканини з великою кількістю остеоцитів; 3 – кістковий мозок; 4 – судинні канали; 5 – залишки ретикулофіброзної тканини. Гематоксилін і еозин, x 100

трабекулами губчастої речовини значної товщини та об'єму. Центральна частина трабекул утворена значною кількістю незамурованих остеоцитів, а на поверхні кісткових балок щільно розміщені ряди ядер остеобластів. Міжтрабекулярні простори містили червоний кістковий мозок, з великою кількістю гемопоетичних клітин. Поєднання гідроксиапатиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом та фібрину, збагаченого тромбоцитами, надає більшої остеоіндукції композитному матеріалу.

Тобто, у контрольній та дослідних групах, крім 4-ї, у період 42-ї доби відбувалася повна репарація кісткових дефектів, хоча вона мала деякі відмінності. Так, за використання комбінації аутобіоматеріалу та гранул гідроксиапатиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом на 42-гу добу регенерат містив значно більшу кількість остеоцитів у товщі трабекул, що свідчило про інтенсивніший перебіг репаративного остеогенезу у порівнянні з іншими дослідними та контрольною групами.

Отже, у губчастій кістковій тканині наростання остеоїду в контрольній і 1-й, 2-й, 3-й та 4-й дослідних групах починалося від країв материнської кістки до центру дефекта та характеризувалося різним ступенем інфільтрації клітинами остеобластичного ряду, зокрема в 1-й, 2-й та 3-й дослідних групах, що свідчить про остеоіндуктивні властивості застосованих матеріалів. Однак, відновлення кісткової травми, у такому випадку все ж супроводжується незбалансованим перебігом процесів остеорепації, оскільки одночасно протікають різні стадії на периферії та у центральній зонах дефекту.

Проте, на відміну від вищезазначених груп, у 5-й дослідній за використання гранул композитного матеріалу у центральних ділянках дефекту також відмічали утворення осередків грубоволокнистої кісткової тканини. Найбільш імовірно, вона формується саме за рахунок остеоіндукції, а також остеокондуктивних властивостей кераміки, адже осередки кісткового регенерату виявляються між та безпосередньо навколо гранул композиту і непов'язані контактом із материнською кісткою. Крім того кісткова тканина

була інтегрована з гранулами композитного матеріалу, а недостатньо чіткі контури навколо композиту свідчили про їх біорезобцію.

Тобто гістоморфологічне дослідження підтверджує результати клініко-рентгенологічних і макроморфологічних досліджень та засвідчує присутність у всіх представлених аутологічних матеріалах наявність остеоіндуктивних властивостей, а кальцій-фосфатної кераміки – остеокондуктивних та остеointegraційних і остеоіндуктивних властивостей, за її поєднання з фібрином, збагаченим тромбоцитами (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Динаміка бальної оцінки гістологічних критеріїв кісткових регенератів компактної та губчастої кістки у кролів**

Групи	Доба 42-а	
	Губчаста речовина пластинчастої кісткової тканини	Компактна речовина пластинчастої кісткової тканини
контрольна група (кров'яний згусток)	21,0±0,41	19,5±0,29
дослідна група №1 (PRP)	21,0±0,41	20,0±0,41
дослідна група №2 (PRF)	27,5±0,29**	25,5±0,29**
дослідна група №3 (i-PRF)	24,5±0,29**	21,5±0,29*
дослідна група №4 (ксенологічний PRF)	15,25±0,25**	15,5±0,29**
дослідна група №5 (PRF+HA/β-TCP-700)	27,8±0,25**	27,8±0,25**

**Примітка.** Значення p: \* – <0,01; \*\* – <0,001, порівняно з показниками контрольної групи.

При цьому за бальною оцінкою гістологічних критеріїв кісткових регенератів на 42-гу добу за типом новоутвореної тканини, об'ємом трабекул та остеонів і щільністю розміщення, кількістю клітин у їх товщі і на поверхні не залежить від типу – губчаста чи компактна речовина пластинчастої кісткової тканини. За імплантації ксенологічного PRF її показники на 42-гу добу репаративного остеогенезу були меншими, ніж у контрольній групі в 1,3–1,4 раза ( $p < 0,001$ ). Натомість за імплантації аутологічних і-PRF, PRF чи композитного остеозаміщення вони виявилися більшими в 1,1–1,2 раза ( $p < 0,01–0,001$ ), в 1,3 ( $p < 0,001$ ) та 1,3–1,4 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно, що засвідчує остеоіндуктивні та остеоінтеграційні властивості.

#### **4.4. Динаміка гематологічних показників**

Будь-яка травма супроводжується реакцією системи крові, зумовленою локальною чи системною цитокінемією із змінами мікроциркуляції та гемодинаміки, гальмуванням еритроцитопоезу та індукцією лейкоцитарних реакцій різних типів [276, 277, 288]. Спрямованість та інтенсивність реакції системи крові значною мірою залежать від характеру і об'єму травм, наявності мікробного фактора чи стороннього тіла і стану імунологічної реактивності організму.

Хоча динаміка гематологічних показників за модельних дирчастих переломів у кролів у цілому відома [278, 279], проте в кожному цільовому експериментальному дослідженні нових матеріалів для остеозаміщення вона потребує додаткової оцінки. У представленому дослідженні це зумовлено, з одного боку, необхідністю моніторингу впливу на репаративний остеогенез технологічно різних типів тромбоцитарних мас та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою, а з другого – додатковим забором, достатньо великого для кролів об'єму крові, для приготування ауто-PRP-матеріалів або ж використанням ксенологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами.

У динаміці гематологічних показників, представлених у таблиці 4.3, після моделювання кісткових дефектів та їх заповнення різними типами

Таблиця 4.3

## Динаміка морфологічних показників та вмісту гемоглобіну в крові за репаративного остеогенезу в кролів

Терміни дослідження, доба	Групи тварин	Еритроцити, Т/л	Лейкоцити, Г/л	Тромбоцити, Г/л	Гемоглобін, Г/л
	Клінічно здорові (n=25)	5,6±0,10	7,1±0,09	208,2±7,78	120,4±1,12
3-я	Контрольна, n=12	4,5±0,08***	7,8±0,13***	401,5±8,57***	108,7±1,57***
	PRP, n=12	4,43±0,07***	7,9±0,11***	405,0±7,23***	109,3±1,33***
	PRF, n=12	4,9±0,12*	7,9±0,31*	456,5±22,85*	111,8±3,40*
	I-PRF, n=12	4,6±0,08***	7,8±0,09***	352,0±9,64****	128,9±2,89****
	Ксенологічний PRF, n=12	4,4±0,07***	8,0±0,11***	408,3±8,15***	110,3±1,79***
	PRF+HA/β-TCP-700, n=12	4,8±0,06***	8,1±0,29**	428,9±9,49***	104,7±2,30***
7-а	Контрольна, n=12	4,9±0,08***	7,5±0,08**	373,5±3,50***	111,4±2,44**
	PRP, n=12	4,8±0,06***	7,6±0,09***	371,7±3,66***	111,7±1,79***
	PRF, n=12	4,9±0,10***	8,5±0,19****	649,5±55,54****	109,3±5,33*
	I-PRF, n=12	4,7±0,06***	7,9±0,08****	364,0±7,48***	110,2±1,80***
	Ксенологічний PRF, n=12	4,8±0,07***	7,6±0,09***	423,3±39,96***	111,1±2,03***
	PRF+HA/β-TCP-700, n=12	4,9±0,18**	9,3±0,57****	402,2±25,02***	105,2±2,11***
14-а	Контрольна, n=12	5,1±0,09***	8,3±0,21***	357,5±4,53***	119,3±2,76
	PRP, n=12	5,0±0,07***	8,3±0,13***	352,5±5,52***	116,5±1,76
	PRF, n=12	5,1±0,17*	8,2±0,27***	625,6±42,13****	129,0±1,67****
	I-PRF, n=12	5,2±0,06**	7,5±0,19**	407,5±4,91****	129,6±1,91****
	Ксенологічний PRF, n=12	5,0±0,09***	8,2±0,15***	367,5±4,29***	117,5±1,63



Продовження таблиці 4.3

	PRF+HA/β-TCP-700, n=12	5,7±0,19**	9,1±0,19***	457,8±22,41***	110,2±2,59***
21-a	Контрольна, n=8	5,1±0,05***	7,6±0,07***	243,3±8,82**	119,7±1,20
	PRP, n=8	5,1±0,04***	7,6±0,07***	252,5±7,96***	121,3±1,23
	PRF, n=8	5,1±0,03***	7,3±0,13	245,8±14,28*	121,0±3,34
	I-PRF, n=8	5,1±0,03***	7,1±0,06***	236,7±6,67**	136,5±2,32***
	Ксенологічний PRF, n=8	5,1±0,04***	7,6±0,07***	248,75±11,09**	117,5±1,39
	PRF+HA/β-TCP-700, n=8	6,1±0,17***	8,3±0,30***	388,3±18,15***	128,8±2,79**
42-a	Контрольна, n=4	5,2±0,09**	7,3±0,11	220,0±10,80	122,5±1,71
	PRP, n=4	5,1±0,05***	7,4±0,18	237,5±20,16	122,5±1,71
	PRF, n=4	5,2±0,07**	7,5±0,14*	220,0±8,17 225,0±2,89*	131±3,49**
	I-PRF, n=4	5,3±0,05*	7,3±0,13	220,0±9,13	139,0±2,12***
	Ксенологічний PRF, n=4	5,2±0,07**	7,5±0,09**	250,0±11,55**	121,5±1,70
	PRF+HA/β-TCP-700, n=4	6,6±0,23***	7,7±0,22*		128,0±1,16***

**Примітка.** Значення p: \* – <0,05, \*\* – <0,01, \*\*\* – <0,001 достовірні відмінності показників, порівняно з контрольною групою у відповідний термін дослідження; • – <0,05, •• – <0,01, ••• – <0,001, порівняно з клінічно здоровими кролями.

тромбоцитарних концентратів і комбінацій PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700 були встановлені певні закономірності.

Зокрема, в усіх групах у період перших 7-и діб репаративного остеогенезу звертав на себе увагу розвиток еритроцитопенії, яка супроводжувала перебіг його запально-резорбтивної стадії. При цьому, в цілому, в групах кількість еритроцитів у периферичній крові зменшувалася в 1,1–1,3 раза ( $p < 0,001$ ). Однак на 3-ю добу у 3-й дослідній групі за використання PRF та у 5-й за остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою із PRF еритроцитопенія виявилася помірною –  $4,9 \pm 0,12$  Т/л та  $4,8 \pm 0,06$  Т/л, відповідно, за фізіологічних меж у кролів – 5,2–7,5 Т/л. Водночас найбільш глибокою еритроцитопенія виявилася за використання ксенологічного PRF (4-а дослідна група) –  $4,4 \pm 0,07$  Т/л (зменшення в 1,3 раза,  $p < 0,001$ ). У період 7-ої доби в усіх групах намітилася тенденція до усунення еритроцитопенії, оскільки кількість еритроцитів коливалася в межах 4,7–4,9 Т/л.

Далі, з 14-ї доби кількість еритроцитів у всіх групах починала поступово збільшуватися, при чому така картина спостерігалася до 42-ої доби дослідження. Проте лише у випадку комплексного остеозаміщення (5-а дослідна група) цей процес виявився динамічним. Тут кількість еритроцитів не тільки відновлювалася на 14-ту добу –  $5,7 \pm 0,19$  Т/л, але й виявилася більшою в 1,1 ( $p < 0,05$ ) та 1,2 раза ( $p < 0,001$ ) на 21-шу і 42-гу добу, відповідно, порівняно з показниками клінічно здорових кролів –  $5,6 \pm 0,1$  Т/л. Водночас в інших групах кількість еритроцитів досягала лише рівня – 5,1–5,3 Т/л, тобто нижньої межі фізіологічної норми.

Концентрація гемоглобіну в крові кролів контрольної та дослідних груп, за виключенням 3-ої, під час перебігу першої стадії репаративного остеогенезу на 3-ю і 7-му добу також знижувалася в 1,1 раза ( $p < 0,05$ – $0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових тварин. При цьому його рівень у жодній із груп не виходив за межі фізіологічної норми (105–150 Г/л). При цьому, хоча уміст у крові в 3-й дослідній групі (I-PRF) на 3-ю добу і збільшився, проте з огляду на величину середньоарифметичної похибки –  $128,9 \pm 2,89$  г/л, тут була

присутня досить виражена варіабельність показників у групі. На 7-му добу його концентрація гемоглобіну в групах становила від  $105,2 \pm 2,11$  до  $111,7 \pm 1,79$  г/л, за відсутності вірогідної різниці між групами.

Натомість на 14-ту добу рівень гемоглобіну почав підвищуватися і в 2-й (PRF) та 3-й (I-PRF) дослідних групах виявився у 1,1 раза вищим ( $p < 0,01$ ), за показник як контрольної, так і групи клінічно здорових кролів.

У період 21-ої доби у більшості груп рівень гемоглобіну нормалізувався, а в 3-й і 5-й дослідних групах він виявився навіть вищим в 1,1 раза ( $p < 0,01$ ), ніж у клінічно здорових тварин. Подібною виявилася ситуація і на 42-гу добу дослідження.

Отже, імплантація у кісткові дефекти в кролів різних типів PRP-матеріалів супроводжується помірною і швидкоплинною еритроцитопенією впродовж перших 7-и діб репаративного остеогенезу, яка менш виражена в групах застосування ауто-PRF-матеріалів, але не ксенологічних. Водночас помірне зменшення концентрації в крові гемоглобіну в цей період відбувається в межах фізіологічної норми. При цьому комплексне застосування PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700 супроводжується достовірно вищим рівнем у крові еритроцитів у період 14–42-ої доби репаративного остеогенезу.

Зміни кількості лейкоцитів (рис. 4.49) у периферичній крові кролів усіх груп у період репаративного остеогенезу також відбувалися у межах показників фізіологічно здорових тварин ( $6\text{--}9,5$  Г/л), хоча впродовж всіх термінів їх рівень здебільшого був дещо вищим (в 1,1 раза), порівняно з клінічно здоровими тваринами ( $p < 0,05\text{--}0,001$ ).

При цьому звертають на себе увагу пікові показники кількості лейкоцитів у 2-й та 5-й дослідних групах на 7-у добу дослідження, які були більшими, ніж у контрольній в 1,1 та 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно. У контрольній, 1-й (PRP) і 4-й (ксенологічний PRF) дослідних групах максимальне підвищення кількості лейкоцитів в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з клінічно здоровими тваринами, реєстрували на 14-ту добу, тоді як у 3-й дослідній їх збільшення в 1,1 раза мало місце лише в період 3–7-ї доби.

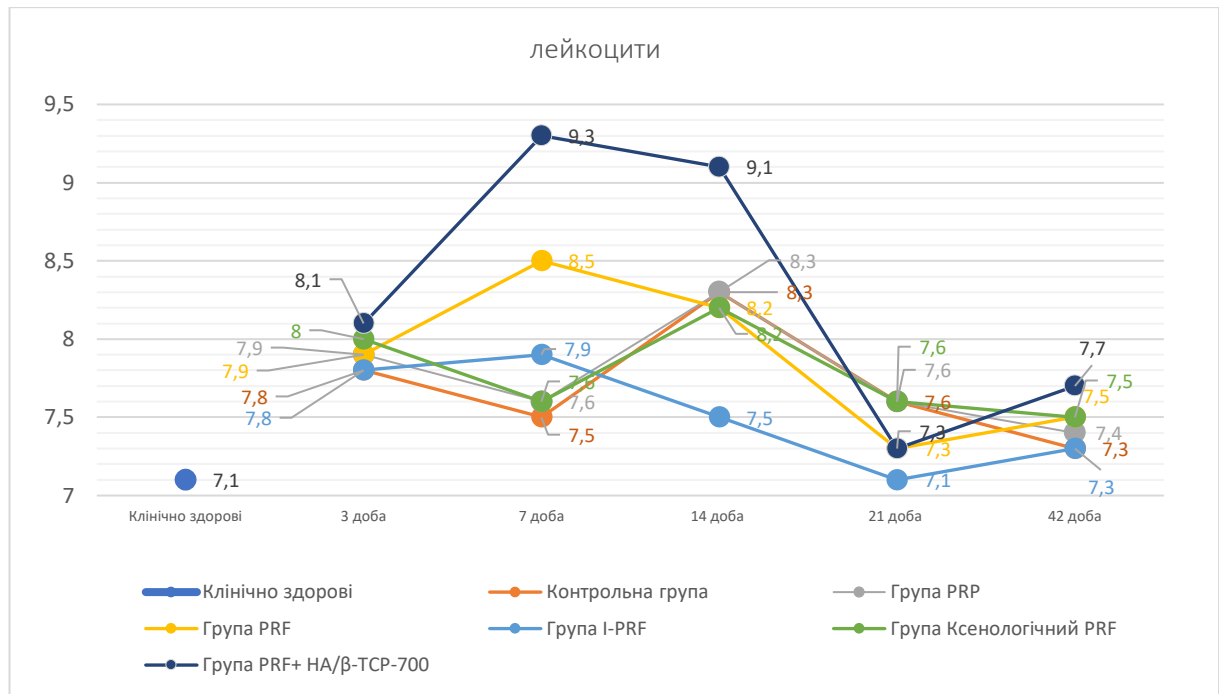


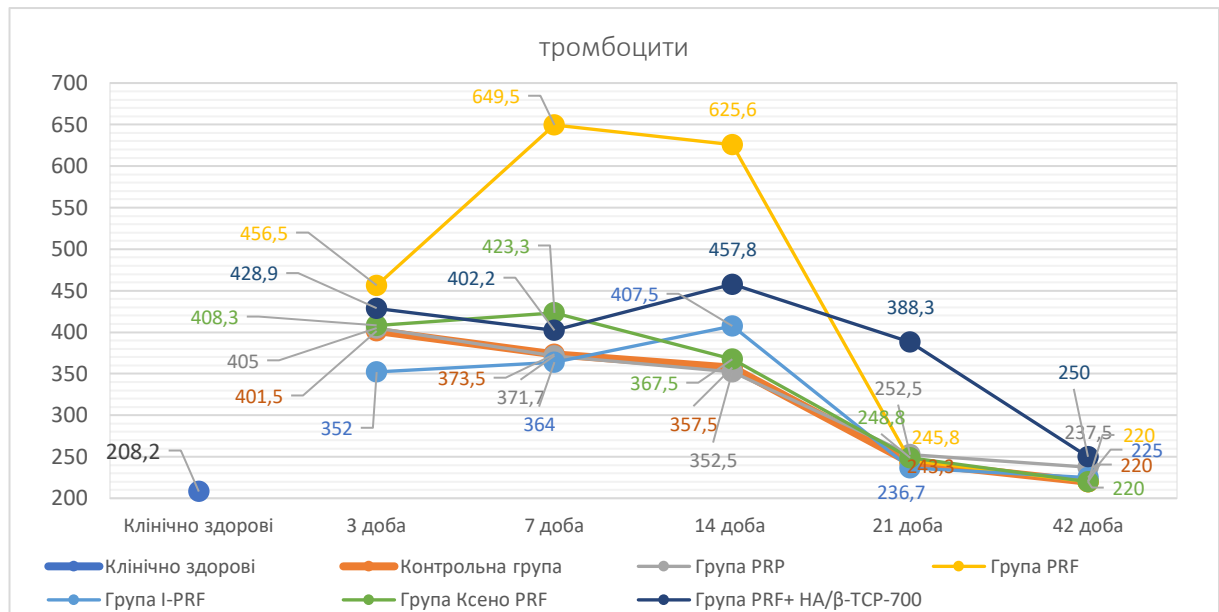
Рис. 4.49. Динаміка кількості лейкоцитів у крові кролів контрольної та дослідних груп

Водночас у 5-й (PRF+HA/β-TCP-700) на 21-шу добу вона все ще була вищою в 1,1 раза ( $p < 0,01$ ), порівняно з контрольною групою, та 1,2 раза ( $p < 0,01$ ) – з клінічно здоровими тваринами.

Отже, імплантація у кісткові дефекти кролів різних типів PRP-матеріалів не зумовлює вираженої лейкоцитарної реакції навіть за використання ксенологічного PRF. Разом з цим остеозаміщення аутологічним PRF та його комбінацією з кальцій-фосфатною керамікою супроводжується більш вираженою лейкоцитарною реакцією, яка однак відбувається в межах фізіологічної норми.

Натомість у динаміці змін кількості тромбоцитів встановлено (рис. 4.50) виражений тромбоцитоз, оскільки у всіх групах вона виходила за межі фізіологічної норми – 125–250 Г/л. На ранньому етапі репаративного остеогенезу, в період 3-ої доби, відбувалося збільшення кількості тромбоцитів у контрольній і дослідних групах, порівняно з клінічно здоровими тваринами, в 1,7–2,2 раза ( $p < 0,05$ – $0,001$ ). При цьому найменший рівень тромбоцитозу виявився за використання I-PRF (3-я дослідна група) – збільшення кількості

тромбоцитів в 1,7 раза, а найбільший у 2-й дослідній – у 2,2 раза та 5-й дослідній групі – в 2,1 раза.



**Рис. 4.50. Динаміка кількості тромбоцитів у крові кролів контрольної та дослідних груп**

В наступному, впродовж 7–14-ї діб у 2-й дослідній групі рівень тромбоцитозу досягав пікових показників –  $649,5 \pm 55,54$  Г/л та  $625,6 \pm 42,13$  Г/л, відповідно, що було більше за показник клінічно здорових тварин у 3 раза ( $p < 0,001$ ), а контрольної групи – в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ). Впродовж 14 діб приблизно на одному рівні тромбоцитоз утримувався в 3-й дослідній групі з використанням I-PRF. Водночас звертає на себе увагу двофазність піків тромбоцитозу в 5-й дослідній групі – на 3-ю добу –  $428,9 \pm 9,49$  Г/л, а потім на 14-у добу –  $457,8 \pm 22,41$  Г/л. Хоча в усіх групах на період 21-ої доби рівень тромбоцитів суттєво зменшився до помірного тромбоцитозу за відсутності достовірної різниці між ними, проте за комбінованого остеозаміщення він був більшим в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ).

Отже, у цілому репаративний остеогенез за модельних дирчастих переломів у кролів супроводжується тривалим, до 3-х тижнів тромбоцитозом, який надзвичайно виражений упродовж 7–14-ї доби за остеозаміщення PRF, а

за його комбінації з PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700 має двохфазну динаміку з піками на 3-ю та 14-ту добу.

Морфофункціональний зв'язок процесів остеогенезу-регенерації-гемопоезу досить відомий [280], а реакція системи крові за неускладненого перебігу репаративного остеогенезу характеризується помірною і нетривалою анемією зі зменшенням кількості еритроцитів і гемоглобіну, лейкоцитарною реакцією та наступною активацією еритроїдного гемопоезу [276, 281, 282].

Встановлена динаміка гематологічних показників у випадку загоєння кісткових дірчастих дефектів за імплантації PRP-матеріалів цілком відповідає таким закономірностям.

Водночас звертає на себе увагу відносно швидке, вже на 14-ту добу, відновлення кількості еритроцитів за остеозаміщення PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700 та навіть їх збільшення в період 21-ї і 42-ї доби в 1,1–1,2 раза ( $p < 0,05$ – $0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових кролів. Хоча динамічні зміни концентрації в крові гемоглобіну відбувалися в межах фізіологічної норми, однак у групах тварин, де імплантували різні технологічні форми PRF, в період 14-ої (PRF та I-PRF), 21-ої та 42-ої діб (I-PRF+комплекс PRF з кальцій-фосфатною керамікою) встановлено піки концентрації гемоглобіну, які перевищували показники клінічно здорових тварин у 1,1–1,2 раза ( $p < 0,01$ ). Тобто загалом імплантація PRF-матеріалів супроводжується динамічним усуненням посттравматичної еритроцитопенії з позитивною динамікою вмісту в крові гемоглобіну.

При цьому лейкоцитарна реакція в межах фізіологічної норми, швидше за все, відображала лише загальні посттравматичні зміни у системі крові.

Натомість тромбоцитарна реакція, на відміну від попередніх досліджень щодо остеозаміщення у кролів кальцій-фосфатною керамікою, легованою Si та Ge [278, 279], виявилася надзвичайно виразною у формі реактивного тромбоцитозу у випадках імплантації щільних форм PRF. Це, ймовірно, зумовлено впливом підвищеної концентрації ростових чи цитокінових факторів на тромбопоетин, який, як відомо [283], прискорює трансформацію

мегакаріоцитів у тромбоцити. Хоча подібна тромбоцитарна реакція спостерігалася і за імплантації ксенологічного PRF, проте в цьому разі насторожує найбільш виражений рівень еритроцитопенії в ранні терміни репаративного остеогенезу.

Таким чином, імплантація у кісткові дефекти PRP-матеріалів супроводжується усуненням посттравматичної еритроцитопенії, особливо динамічним за комбінації PRF з HA/ $\beta$ -TCP-700, реактивним тромбоцитозом, найбільш вираженим за використання щільних форм PRP, що може бути свідченням їх позитивного впливу на репаративний остеогенез.

#### **4.5. Біохімічні показники**

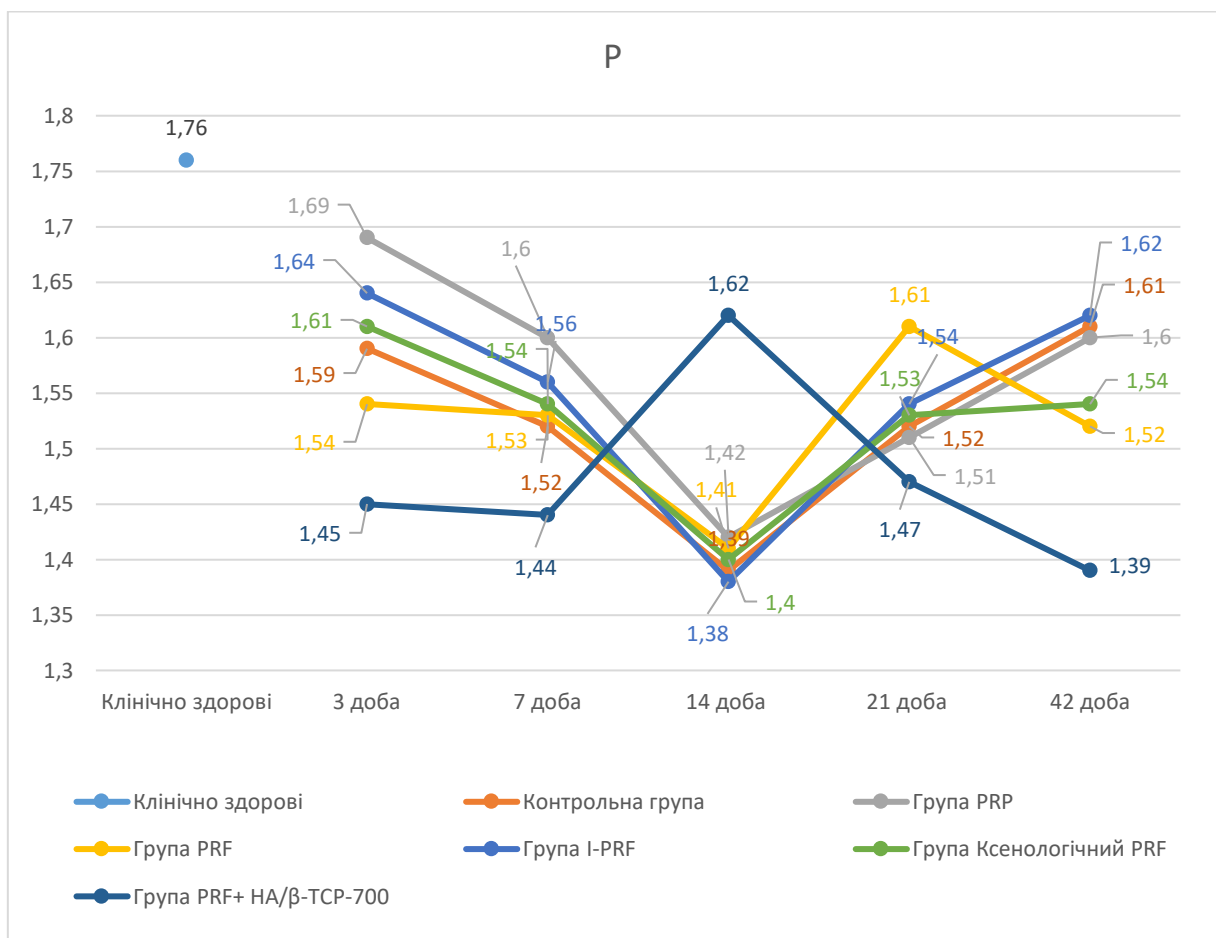
Травма кісткової тканини, як і будь-яка травма інших типів тканин, супроводжується низкою біохімічних реакцій, які відбуваються в межах загальних закономірностей запальної судинно-мезенхімальної реакції з наступними проліферативними процесами. Водночас запально-репаративний процес за кісткової травми має суттєві відмінності зумовлені, в першу чергу, наявністю в кістковій тканині мінерального компонента, що складає близько 60–70 % об'єму кістки, а її метаболізм регулюється комплексом факторів системної (гормони щитоподібної та паращитоподібної залоз, статеві і глюкокортикостероїдні гормони) та локальної (простагландини, цитокіни, фактори росту) дії [36, 112, 125–130]. При цьому посттравматична гематома виконує тригерну роль в індукції репаративного остеогенезу завдяки своїй фібриновій матриці та низці факторів росту, а ділянка пошкодження спочатку звільняється від мінерального компоненту та потім регенерат піддається мінералізації. В зв'язку з цим можливий вплив на перебіг репаративного остеогенезу та його біохімічні реакції і PRP-матеріалів, які є частиною природної гематоми.

##### **4.5.1. Динаміка маркерів кісткового метаболізму**

В останні роки доведено як експериментальними [284, 289], так і

клінічними дослідженнями [285], що вміст у сироватці крові Ca і P не відображає стан кісткового метаболізму за репаративного остеогенезу в тварин. Проте такі системні фактори як гормони щито- чи паращитоподібної залоз можуть опосередковано змінювати їх концентрацію через імунні механізми під впливом ростових факторів чи цитокінів [36, 128, 129].

У представленому дослідженні зміни концентрації Ca і P у динаміці репаративного остеогенезу відбувалися в межах фізіологічної норми – 1,4–3,1 ммоль/л та 1,3–2,2 ммоль/л, відповідно (табл. 4.4). Заразом звертає на себе увагу динаміка вмісту в сироватці крові P. В цьому разі присутня загальна тенденція до його зниження впродовж перших 14-ти діб, а потім – поступового підвищення (рис. 4.51). На 3-ю добу найбільш суттєвим зменшення



**Рис. 4.51. Динаміка вмісту фосфору в сироватці крові кролів за імплантації у кісткові дефекти різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**



Таблиця 4.4

**Динаміка вмісту макроелементів і маркерів кісткового метаболізму у сироватці крові за імплантації у кісткові дефекти PRP-матеріалів**

Терміни дослідження, доба	Групи тварин	P, ммоль/л	Ca, ммоль/л	ЗЛФ, од./л	КЛФ, од./л	ТрКФ, од./л
	Клінічно здорові (n=25)	1,76±0,018	2,43±0,03	66,37±0,82	49,1±0,82	13,41±0,63
3-я (n=12 у кожній групі)	Контрольна	1,59±0,02***	2,46±0,07	75,16±0,22***	49,36±0,39	47,71±0,63***
	1-а, PRP	1,69±0,01****	2,40±0,01	78,56±0,45****	50,65±0,80	48,95±0,72***
	2-а, PRF	1,54±0,02***	2,41±0,02	92,81±1,40****	52,9±0,71****	49,56±0,71***
	3-я, I-PRF	1,64±0,01***	2,38±0,01	90,14±1,16****	51,89±1,11*	49,13±0,84***
	4-а, Ксен. PRF	1,61±0,02***	2,39±0,03	82,23±0,51****	50,23±0,74	47,24±0,39***
	5-а, PRF+HA/β-TCP-700	1,45±0,01****	2,37±0,02	84,11±0,38****	51,26±0,68**	47,74±0,01***
7-а (n=12 у кожній групі)	Контрольна	1,52±0,01***	2,40±0,01	68,50±0,92	47,06±0,44**	43,00±0,82***
	1-а, PRP	1,60±0,01****	2,38±0,02	78,57±0,26****	51,77±1,00****	43,5±0,95***
	2-а, PRF	1,53±0,01***	2,38±0,01	80,74±0,32****	48,98±0,47**	48,84±0,50****
	3-я, I-PRF	1,56±0,01****	2,42±0,02	80,46±0,32****	51,87±0,88****	44,63±0,52***
	4-а, Ксен. PRF	1,54±0,02***	2,40±0,02	79,31±0,27****	50,27±0,78**	44,05±0,62***
	5-а, PRF+HA/β-TCP-700	1,44±0,02****	2,40±0,01	77,73±0,57****	55,77±0,87****	44,78±0,60***
14-а	Контрольна	1,39±0,02***	2,42±0,03	65,90±0,44	45,82±0,66***	24,00±0,39***
	1-а, PRP	1,42±0,01***	2,57±0,02****	85,38±0,20****	56,56±1,19****	29,30±0,69****

Продовження таблиці 4.4

(n=12 у кожній групі)	2-а, PRF	1,41±0,01 <sup>***</sup>	2,56±0,03 <sup>***</sup>	104,85±2,83 <sup>***</sup>	60,70±1,31 <sup>***</sup>	29,42±0,86 <sup>***</sup>
	3-я, I-PRF	1,38±0,01 <sup>***</sup>	2,58±0,01 <sup>***</sup>	81,94±2,94 <sup>***</sup>	54,80±0,75 <sup>***</sup>	25,52±0,64 <sup>***</sup>
	4-а, Ксен. PRF	1,40±0,02 <sup>***</sup>	2,43±0,02	71,25±1,56 <sup>**</sup>	49,02±1,12 <sup>*</sup>	25,80±0,62 <sup>***</sup>
	5-а, PRF+HA/β-TCP-700	1,62±0,04 <sup>***</sup>	2,61±0,01 <sup>***</sup>	93,10±1,55 <sup>***</sup>	59,78±0,99 <sup>***</sup>	25,76±0,39 <sup>***</sup>
21-а (n=8 у кожній групі)	Контрольна	1,52±0,01 <sup>***</sup>	2,29±0,01 <sup>***</sup>	72,30±0,69 <sup>***</sup>	47,48±0,26 <sup>**</sup>	19,08±0,31 <sup>***</sup>
	1-а, PRP	1,51±0,01 <sup>***</sup>	2,52±0,02 <sup>***</sup>	74,98±0,17 <sup>***</sup>	48,65±1,02	21,68±0,72 <sup>***</sup>
	2-а, PRF	1,61±0,01 <sup>***</sup>	2,60±0,01 <sup>***</sup>	79,15±1,85 <sup>***</sup>	53,85±0,90 <sup>***</sup>	25,50±0,40 <sup>***</sup>
	3-я, I-PRF	1,54±0,01 <sup>***</sup>	2,45±0,01 <sup>***</sup>	81,23±0,83 <sup>***</sup>	58,20±0,73 <sup>***</sup>	20,06±0,39 <sup>***</sup>
	4-а, Ксен. PRF	1,53±0,02 <sup>***</sup>	2,38±0,02 <sup>**</sup>	75,32±0,71 <sup>***</sup>	52,08±0,81 <sup>***</sup>	19,85±0,53 <sup>***</sup>
	5-а, PRF+HA/β-TCP-700	1,47±0,01 <sup>***</sup>	2,72±0,02 <sup>***</sup>	76,02±0,88 <sup>***</sup>	51,82±0,61 <sup>***</sup>	20,28±0,64 <sup>***</sup>
42-а (n=4 у кожній групі)	Контрольна	1,61±0,01 <sup>***</sup>	2,33±0,02 <sup>*</sup>	76,23±0,99 <sup>***</sup>	57,10±1,21 <sup>***</sup>	24,70±0,95 <sup>***</sup>
	1-а, PRP	1,60±0,03 <sup>***</sup>	2,47±0,02 <sup>**</sup>	75,30±1,60 <sup>***</sup>	51,90±0,78 <sup>**</sup>	32,47±1,56 <sup>***</sup>
	2-а, PRF	1,52±0,03 <sup>***</sup>	2,31±0,02 <sup>**</sup>	83,23±1,60 <sup>***</sup>	51,67±0,79 <sup>***</sup>	46,97±0,26 <sup>***</sup>
	3-я, I-PRF	1,62±0,01 <sup>***</sup>	2,38±0,03	82,23±2,69 <sup>***</sup>	49,53±1,71 <sup>*</sup>	38,10±1,55 <sup>***</sup>
	4-а, Ксен. PRF	1,54±0,02 <sup>***</sup>	2,39±0,02	78,52±1,02 <sup>***</sup>	53,05±0,74 <sup>***</sup>	25,57±0,87 <sup>***</sup>
	5-а, PRF+HA/β-TCP-700	1,39±0,02 <sup>***</sup>	2,37±0,02	82,20±1,76 <sup>***</sup>	55,53±0,41 <sup>***</sup>	36,53±0,38 <sup>***</sup>

**Примітка.** Значення p: \* – <0,05, \*\* – <0,01, \*\*\* – <0,001 достовірні відмінності показників, порівняно з контрольною групою у відповідний термін дослідження; • – <0,05, •• – <0,01, ••• – <0,001, порівняно з нормою.

концентрації Р виявилося в 2-й дослідній групі (PRF) – в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ) та в 5-й дослідній групі (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) – в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з показниками клінічно здорових тварин.

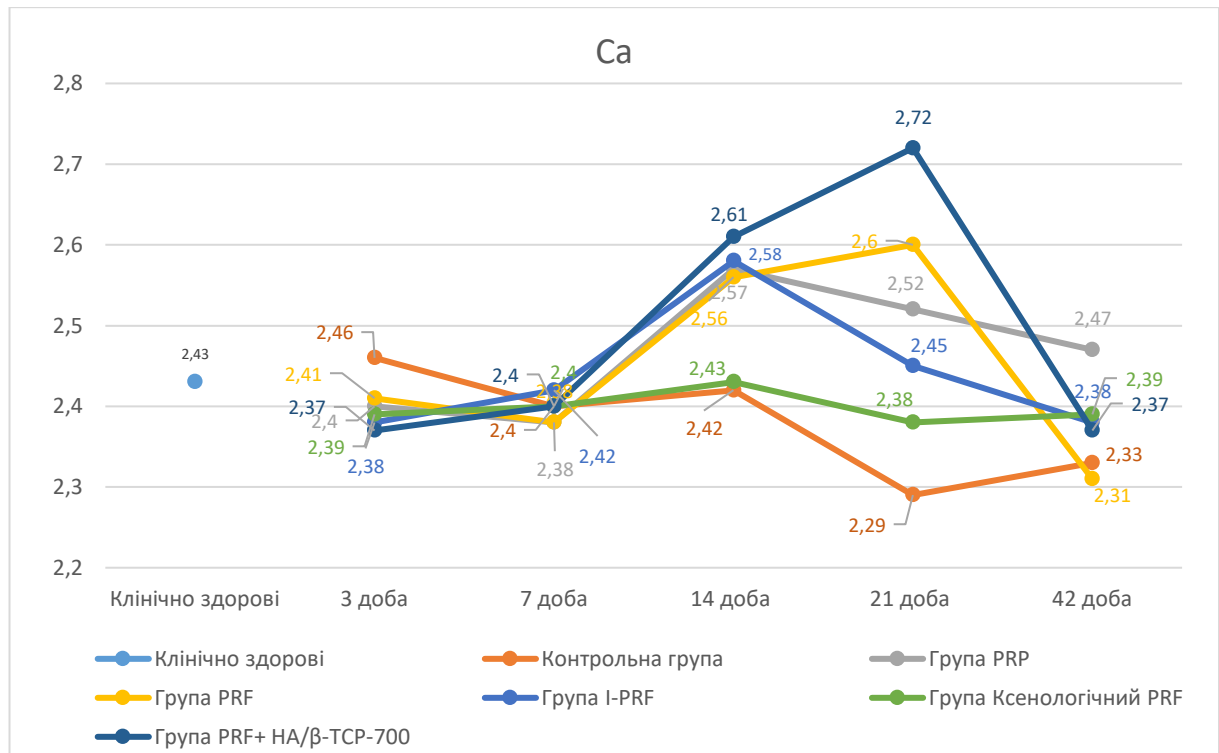
Упродовж 7-ої та 14-ої доби в решти груп цей процес поглиблювався і в період 14-ої в контрольній і в 1–4-й групах рівень Р виявився меншим, ніж у клінічно здорових кролів, у 1,2–1,3 раза ( $p < 0,001$ ), за відсутності достовірної різниці між цими групами. Водночас у 5-й дослідній групі концентрація Р була вже більшою, порівняно з контрольною групою, в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ). Надалі в цій групі відбулося зменшення вмісту в сироватці крові Р до майже нижньої межі фізіологічної норми –  $1,39 \pm 0,02$  ммоль/л ( $p < 0,001$ ).

Певною мірою така динаміка концентрації Р виявилися подібною і в групі з PRF (3-я дослідна, але з піком на 21-шу добу –  $1,61 \pm 0,01$  ( $p < 0,001$ )). Натомість у решти груп подібний рівень Р досягався на 42-у добу за виключенням групи з ксенологічним PRF –  $1,54 \pm 0,02$  ммоль/л. Тобто за використання композитного PRF має місце чітко вираженої фазності динаміки рівня Р, яка менш помірна і більш тривала у часі за імплантації інших PRP – матеріалів.

Концентрація загального Са в сироватці крові кролів контрольної та дослідних груп (рис. 4.52) впродовж дослідження коливалася в межах фізіологічної норми (1,4–3,1 ммоль/л). У період 3-ої та 7-ої діб будь-яких її змін не встановлено у всіх групах.

Проте на 14-ту добу в усіх дослідних групах, окрім 4-ї (ксенологічний PRF), рівень у сироватці крові Са виявився вищим у 1,1 раза ( $p < 0,01$  –  $p < 0,001$ ), порівняно як із клінічною здоровими тваринами, так із контрольною групою.

На 21-шу добу в контрольній групі концентрація Са знизилася в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових тварин, тоді як у 5-й дослідній групі вона досягала піку –  $2,72 \pm 0,02$  ммоль/л ( $p < 0,001$ ), а за використання ксенологічного PRF, навпаки, найменшого рівня –  $2,38 \pm 0,02$  ммоль/л ( $p < 0,001$ ). Далі, у період 42-ї доби, у контрольній групі його вміст у сироватці крові дещо підвищився в напрямку показника клінічно здорових



**Рис. 4.52. Динаміка вмісту кальцію в сироватці крові кролів за імплантації у кісткові дефекти різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

тварин.

Водночас у дослідних групах рівень Ca, навпаки, дещо знизився і вже не мав достовірної різниці з показниками клінічно здорових тварин. Лише в групі з використанням PRF він виявився меншим у 1,1 раза ( $p < 0,01$ ).

Доповненням до розглянутої динаміки концентрацій у сироватці крові Ca і P може бути співвідношення цих макроелементів, яке називають індексом Петерсона (рис. 4.53). На 3-ю добу було встановлено підвищення цього індексу в усіх групах, окрім 1-ї дослідної (PRP). Далі, на 14-ту добу його збільшення реєстрували у 1-й, 3-й, 4-й і 5-й дослідних групах, тоді як у контрольній та 2-й дослідній (PRF) він залишався незмінним. Вже з 14-ї доби виникли деякі розбіжності. В усіх групах, окрім 5-ї, відмічали тенденцію до підвищення індекса Петерсона з досягненням максимальних значень у цей період дослідження, а далі відбувалося поступове зниження його показників. Найвище значення Ca:P на 14-ту добу було зареєстроване в 3-й дослідній групі

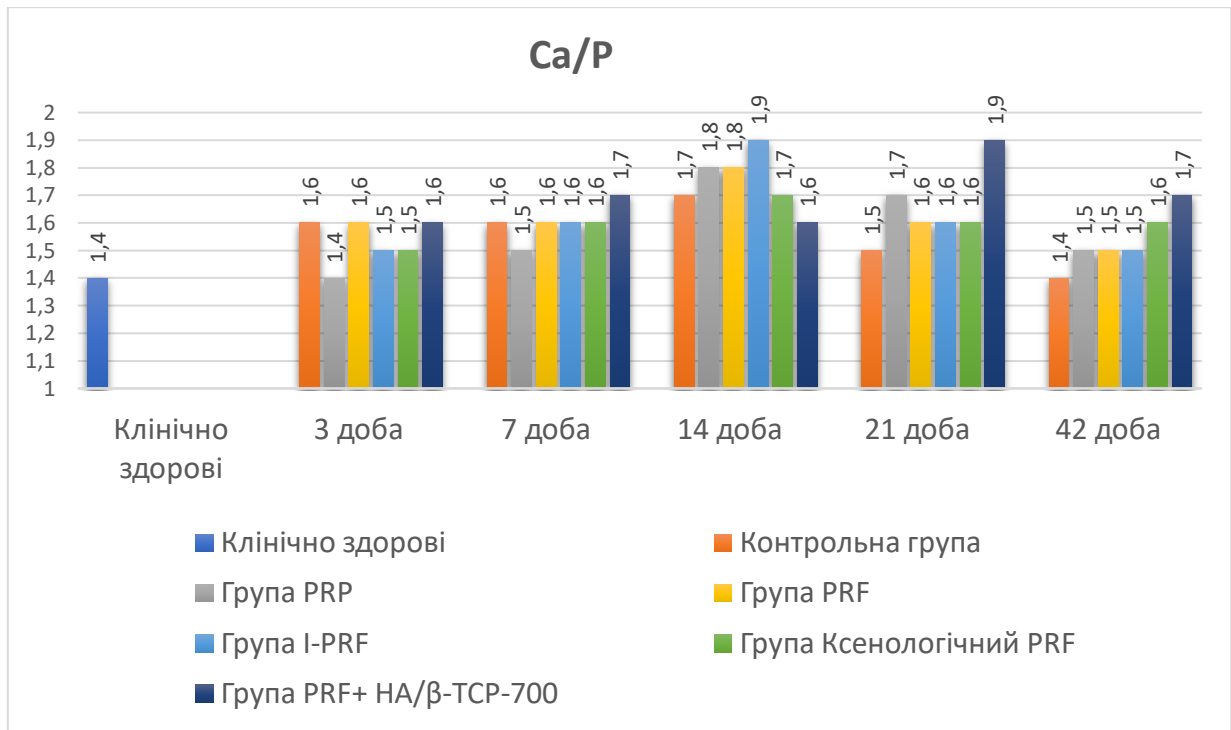


Рис. 4.53. Динаміка кальцій-фосфорного співвідношення у сироватці крові кролів за імплантації у кісткові дефекти різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою

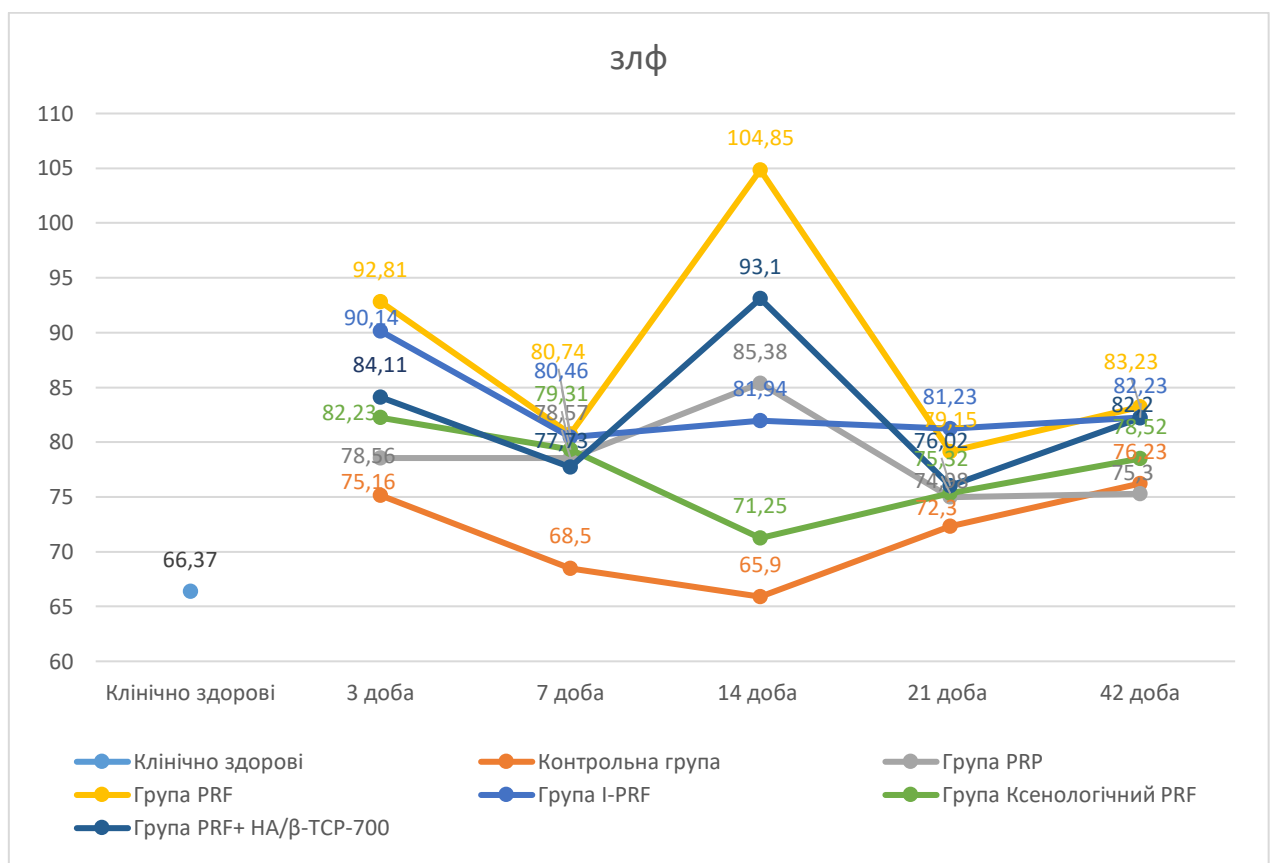
(i-PRF), що становило 1,9:1. Однак, за остеозаміщення PRF+HA/β-TCP-700 (5-а група) у цей період (14-а доба), навпаки, реєстрували зниження індекса з наступним піком на 21-шу добу – 1,9:1, а далі на 42-гу добу відбулося його зниження до 1,7:1.

Звертає на себе увагу те, що на 42-гу добу в контрольній групі індекс Петерсона виявився найнижчим та становив 1,4:1. Крім того, в 5-й дослідній групі, на відміну від інших груп, відмічали дві фази збільшення індексу, що свідчило про більш інтенсивний перерозподіл макроелементів, а відповідно, ймовірно, і репаративний остеогенез.

Остеорезорбція і остеогенез – два тісно взаємопов'язані між собою біологічні процеси. Вони є невід'ємною частиною як фізіологічної, так і репаративної регенерації кісткової тканини, та супроводжуються динамічними змінами кісткового метаболізму, що регулюється системними і локальними факторами. Оцінити кістковий метаболізм можна шляхом

визначення активності у сироватці крові ряду специфічних кісткових біохімічних маркерів. До них відносять лужну фосфатазу, але, головним чином, її кістковий ізофермент, який відображає функціональну активність остеобластів. У свою чергу тартратрезистентна кисла фосфатаза засвідчує активність остеокластів [286, 287].

Встановлено, що після моделювання кісткових дефектів та розміщення в них різних типів імплантів PRP-матеріалів, активність загальної лужної фосфатази (ЗЛФ) (рис. 4.54) в усіх дослідних групах збільшувалася і була



**Рис. 4.54. Динаміка вмісту лужної фосфатази в сироватці крові кролів за імплантації у кісткові дефекти різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

достовірно вищою, порівняно з показниками клінічно здорових тварин, протягом усього періоду дослідження. Водночас у контрольній групі на 7-му та 14-ту добу різниця з показником клінічно здорових тварин виявилася не

достовірною. Зокрема, на 3-ю добу в дослідних групах вона була більша у 1,1-1,4 рази ( $p < 0,001$ ), на 7-му добу – в 1,2 рази ( $p < 0,001$ ), на 14-ту – в 1,1–1,6 ( $p < 0,01–0,001$ ), на 21-шу – в 1,1–1,2 ( $p < 0,001$ ), на 42-гу – 1,1–1,3 рази ( $p < 0,001$ ). Тобто ступінь підвищення активності ЗЛФ в дослідних групах виявився неоднозначним.

У контрольній групі її пік встановлено на 3-ю добу –  $75,16 \pm 0,22$  од/л ( $p < 0,001$ ), та на 42-гу добу –  $76,23 \pm 0,99$  од/л ( $p < 0,001$ ), загалом лише в 1,1 рази.

Децю вищим рівень активності ЗЛФ виявився у 1-й дослідній групі (PRP). На 3-ю і 7-му добу вона була вищою за показники контрольної групи в 1,2 рази ( $p < 0,001$ ), а на 14-ту – в 1,3 рази ( $p < 0,001$ ), яка в наступному динамічно зменшувалася до рівня 3-ї доби. Подібною траєкторія підвищення активності ЗЛФ була і в разі імплантації ксенологічного PRF, але з піком (збільшення в 1,2 рази,  $p < 0,001$ ) на 3-ю добу –  $82,23 \pm 0,51$  од/л. В решті груп прослідковувалася певна фазність збільшення активності ЗЛФ.

Так, для імплантації i-PRF був характерним пік активності ЗЛФ на 3-ю добу (збільшення в 1,4 рази,  $p < 0,001$ ) –  $90,14 \pm 1,16$  од/л, та утримання на рівні  $81,23–82,23$  од/л (збільшення в 1,2 рази  $p < 0,001$ ) впродовж 14–42-ї доби.

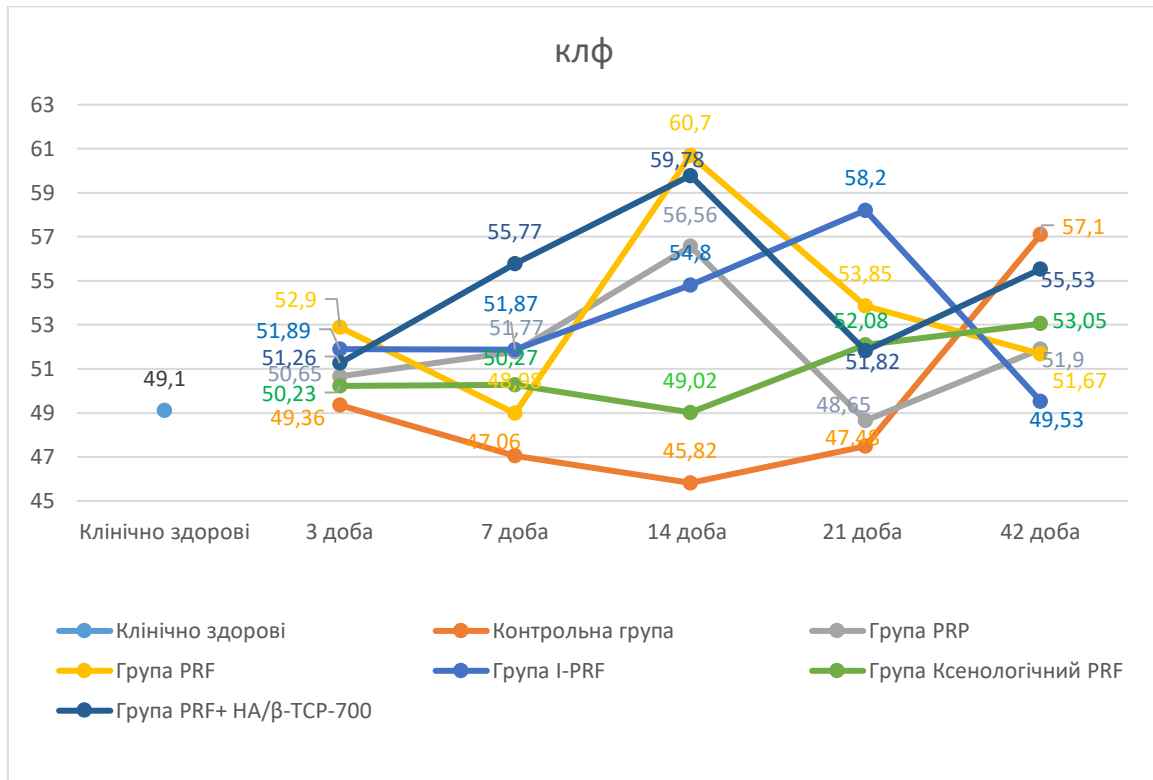
За використання PRF перший пік активності ЗЛФ проявився на 3-ю добу (збільшення в 1,4 рази,  $p < 0,001$  –  $92,81 \pm 1,4$  од/л), а другий – з найвищим серед усіх груп показником у  $104,85 \pm 2,83$  од/л.

На противагу цьому остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою з PRF більш помірними піками активності ЗЛФ: на 3-ю добу (збільшення в 1,3 рази,  $p < 0,001$ ) –  $84,11 \pm 0,38$  од/л; на 14-ту (збільшення в 1,4 рази,  $p < 0,001$ ) –  $93,10 \pm 1,55$  од/л.

Хоча в усіх випадках на 42-гу добу, включаючи і контрольну групу, рівень активності ЗЛФ залишався достовірно підвищеним, проте в 2-й та 5-й дослідній групі він був у 1,1 рази вищим ( $p < 0,05$ ), ніж у контрольній.

ЗЛФ – відображає і запальний компонент, пов'язаний з продукцією білків гострої фази, особливо, коли порівняти показники її активності в дослідних групах з ксенологічним PRF чи контролем.

Дещо подібною виявилася і динаміка активності у сироватці крові кісткового ізоферменту лужної фосфатази (КЛФ) – загальновизнаного маркера остеогенезу, (рис. 4.55), яка однак і мала свої суттєві відмінності.



**Рис. 4.55. Динаміка вмісту кісткового ізоферменту лужної фосфатази у сироватці крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

На 3-ю добу репаративного остеогенезу встановлено збільшення активності КЛФ лише у 2-й, 3-й та 5-й дослідних групах з достовірною різницею у 2,2–3,8 од/л ( $p < 0,05–0,001$ ), порівняно як з клінічно здоровими тваринами, так і контрольною групою. Тобто це були групи, у яких проводили імплантацію з ауто PRF-матеріалами.

Поряд з цим у контрольній групі активність КЛФ впродовж 7–21-ї діб була достовірно зниженою на 2–3,3 од/л ( $p < 0,01–0,001$ ) і лише на 42-гу добу збільшилася в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), досягнувши  $57,1 \pm 1,21$  од/л, при  $49,1 \pm 0,82$  од/л у клінічно здорових тварин.



Подібною виявилася динаміка активності КЛФ і за імплантації ксенологічного PRF, за якої вона досягала максимальних показників лише на 21-шу та 42-гу добу, перевищуючи показник клінічно здорових кролів ледь у 1,1 рази ( $p < 0,01$ ).

Рівень активності КЛФ за імплантації PRP помірно підвищувався в 1,1 рази ( $p < 0,05-0,001$ ) впродовж перших 14-и діб репаративного процесу, і досягав максимального значення –  $56,56 \pm 1,19$  од/л (збільшення в 1,2 рази,  $p < 0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових кролів. Далі, на 21-шу добу він нормалізувався, а на 42-гу дещо підвищився до  $51,9 \pm 0,78$  од/л ( $p < 0,01$ ), тобто за використання PRP спостерігалася певна двофазність у динаміці змін активності КЛФ, яка за імплантації аутологічного PRF була більш виражена.

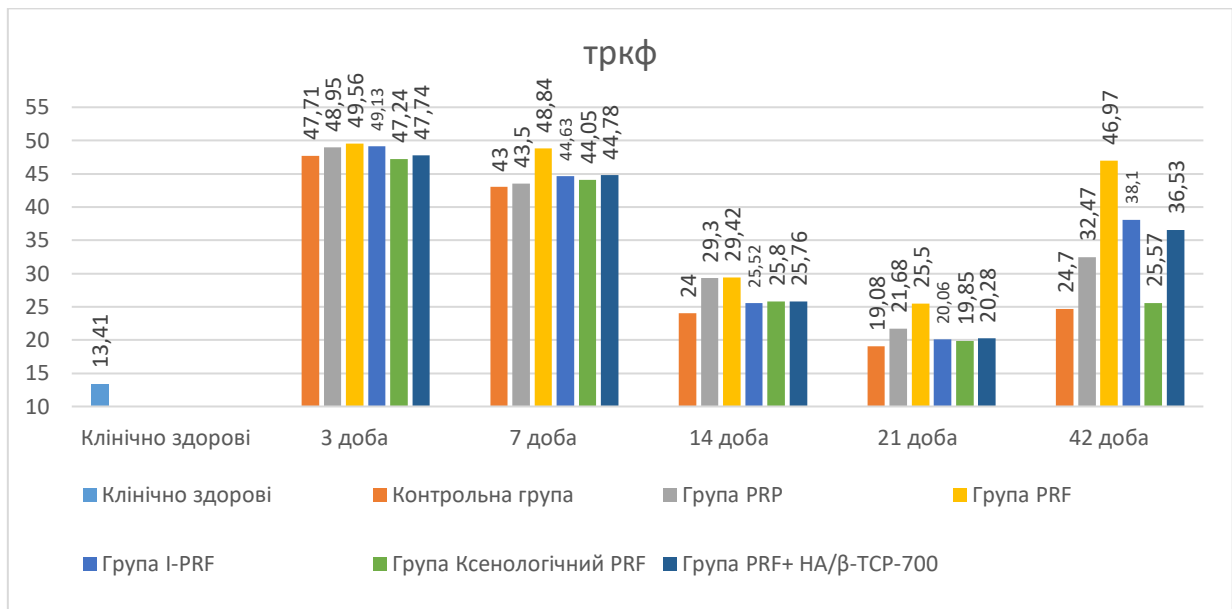
Зокрема, в 2-й дослідній групі перший пік підвищення активності КЛФ відбувся на 3-ю добу –  $52,9 \pm 0,71$  од/л (збільшення в 1,1 рази,  $p < 0,01$ ). Далі, на 7-му добу вона нормалізувалася, а на 14-у добу було зареєстровано її пік –  $60,7 \pm 1,31$  од/л (збільшення в 1,2 рази,  $p < 0,001$ ). Впродовж 21-ї та 42-ї доби рівень активності КЛФ в цій групі залишався все ще підвищеним у 1,1 рази ( $p < 0,01$ ).

За остеозаміщення кісткових дефектів кальцій-фосфатною керамікою з PRF активність КЛФ динамічно збільшувалася вже з 3-ї доби і на 7-му добу вона виявилася більшою в 1,1–1,2 рази ( $p < 0,001$ ), ніж у решти груп, а на 14-ту добу досягла пікового значення –  $59,78 \pm 0,99$  од/л. У наступному, на 21-шу добу вона дещо зменшилася, а на 42-гу добу знову мало місце її пікової активності –  $55,53 \pm 0,41$  од/л.

В цілому впливає, що за рівнем і фазністю динамічних змін активності КЛФ аутологічний PRF зумовлює суттєвий вплив на інтенсивність процесів остеогенезу, як і у випадку його комбінації з osteoamщувальним матеріалом набувають потужного характеру, а це в свою чергу свідчить про osteoіндуктивні властивості PRF.

Поряд з цим звертає на себе увагу неповне співпадіння динаміки ЗЛФ і КЛФ, особливо у випадках відсутності підвищення активності останньої. Тобто підвищення рівня лише ЗЛФ відображає активність запального компонента репаративного процесу і власне реакцією гострої фази.

Поряд з цим рівень активності у сироватці крові тартратрезистентної кислоти фосфатази (ТрКФ) (рис. 4.56), яка відображає активність остеокластів і, відповідно, ступінь кісткової резорбції, протягом 42-х діб дослідження у



**Рис. 4.56. Динаміка вмісту тартрат-резистентної кислоти фосфатази у сироватці крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

контрольній та дослідній групах виявився в цілому надзвичайно вищим за показник клінічно здорових кролів ( $p < 0,001$ ), а в окремих групах реєстрували пікові значення цього біохімічного маркера кісткового метаболізму.

В першу чергу слід відмітити певну однотипність динаміки ТрКФ, особливо у ранній посттравматичний період і запально-резорбтивну стадію репаративного остеогенезу. Так на 3-ю добу її активність збільшувалася в 3,5–3,7 рази ( $p < 0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових тварин, за відсутності достовірної різниці між групами.

Надалі відмітили поступове зменшення активності ТрКФ, що мало загальну тенденцію, хоча і до 42-ї доби вона не повернулася до рівня клінічно здорових тварин. Зокрема, на 7-му добу її рівень у переважної більшості груп залишався підвищеним у 3,2–3,3 раза ( $p < 0,001$ ), а в другій дослідній групі (PRF) – в 3,6 раза ( $p < 0,001$ ).

На 14-у добу в більшості груп активність ТрКФ знаходилася в межах 24–25,8 од/л, а в 1-й і в 2-й дослідних групах – 29,3–29,42 од/л, що було в 1,8–1,9 раза ( $p < 0,001$ ) та 2,2 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно, вище за показник здорових тварин.

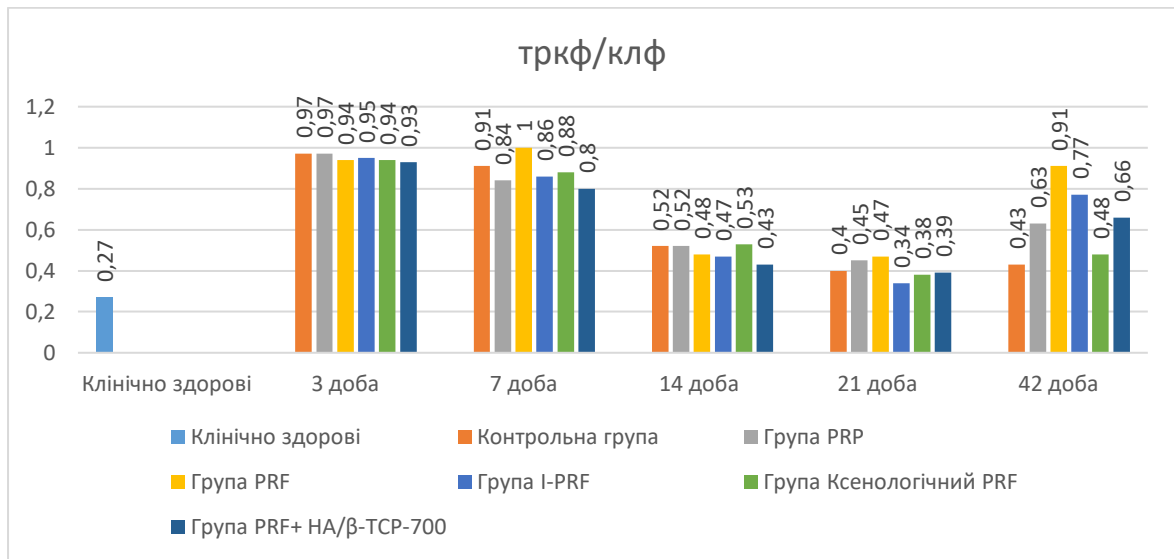
При чому, незважаючи на подальше зниження активності ТрКФ в усіх групах, на 21-шу добу загальна картина її рівнів залишилася попередньою.

Однак на 42-гу добу встановлена нова хвиля підвищення активності ТрКФ в групах, ступінь якого залежав від типу імплантованого матеріалу. Найменшим його рівень виявився в контрольній і 4-й дослідній (ксенологічний PRF) групах – збільшена активність у 1,8 та 1,9 раза ( $p < 0,001$ ) відповідно. Водночас у 1-й дослідній групі (PRP) вона була збільшена в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ), в 2-й (PRF) – в 3,5 раза ( $p < 0,001$ ), у 3-й (i-PRF) – у 2,8 раза ( $p < 0,001$ ), а у 5-й (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) – у 2,7 раза ( $p < 0,001$ ), за достовірної різниці з показником і контрольної групи.

Фізіологічна регенерація кісткової тканини у ссавців різних видів відбувається перманентно із запрограмованим урівноваженням процесів остеорезорбції та остеогенезу, частково їх можна охарактеризувати співвідношенням активності тартрат-резистентної кислоти та кісткового ізоферменту лужної фосфатази (рис. 4.57), тобто фосфатазного коефіцієнта (ФК).

В результаті такого аналізу впливає закономірність двохфазності остеорезорбтивних процесів, які зумовлені остеокластичною реакцією, що відображається через активність ТрКФ. Перша фаза пов'язана із запально-резорбтивною стадією репаративного остеогенезу в період 3–7-ої діб після формування кісткового дефекту, яка не залежить від типу імплантованого PRP

– матеріалу. Далі, в період 14–21-ої діб має місце інтерфаза з помірно підвищеною активністю ТрКФ. В свою чергу на 42-гу добу активація остеорезорбтивних процесів зумовлена ремоделюванням кісткового регенерату. Поряд з цим з огляду на ступінь збільшення активності ТрКФ ці



**Рис. 4.57. Динаміка співвідношення активності ТРкФ до КЛФ у сироватці крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

процеси є більш оптимізовані у разі комбінації PRF з кальцій-фосфатною керамікою, ніж використання власне лише PRP – матеріалів.

За репаративного остеогенезу на це співвідношення впливають об'єм кісткової травми, інтенсивність неоангіогенезу, молекулярно-біологічні механізми його стадій, об'єм кісткового регенерату та ступінь інтеграції останнього з материнською кісткою. Чим вищий цей показник, тим більше виражені процеси остеорезорбції.

На 3-ю добу добу репаративного остеогенезу процеси остеорезорбції різко превалювали в усіх групах, порівняно з показником здорових тварин, але все ж менш виражені вони були в групах імплантації PRF-матеріалів. Найменшим фосфатазний коефіцієнт у сукупності трьох термінів дослідження з 7-ої до 21-ої доби виявився в 5-й групі (PRF+HA/β-TCP-700), що свідчило про інтенсивний остеогенез, а підвищення величини фосфатазного

співвідношення на 42-гу добу свідчило про ремоделювання кісткового регенерату, що відбувається за помірної остеорезорбції, а в цілому про оптимізований перебіг консолидації модельного перелому.

Водночас загоєння кісткових дефектів під кров'яним згустком у контрольних тварин супроводжувалося в перші 7 діб високим фосфатазним коефіцієнтом, який надалі зменшувався вдвічі та до 42-ї доби коливався в межах 0,43–0,52:1, що свідчило про тривалий процес формування кісткового регенерату, поступове заповнення ним кісткового дефекту. Тобто в одних його осередках відбувалися процеси остеогенезу, а в інших остеорезорбції. Подібною виявилася закономірність перебігу репаративного процесу і у випадку імплантації ксенологічного PRF.

Натомість у групах імплантації інших PRP – матеріалів на 42-гу добу, як і у 5-й дослідній групі мало місце суттєве підвищення фосфатазного коефіцієнта, як результату ремоделювальної остеорезорбції найбільш вираженого в групах з аутологічним PRF (2-а група) та і-PRF (3-я група). Останнє пояснюється більшим об'ємом кісткового регенерату, ніж у 5-й дослідній групі, у якій новоутворена кісткова тканина інтегрувалася з кальцій-фосфатною матрицею.

Отже, за сукупністю динаміки індекса Петерсона, активності загальної лужної фосфатази та її кісткового ізофермента і тартратрезистентної кислоти фосфатази, а також їх коефіцієнта співвідношення PRP–матеріали за ефективністю та оптимальністю впливу на репаративний остеогенез за кісткових дефектів можна розмістити в наступній послідовності – ксенологічний PRF < кров'яний згусток < PRP < і-PRF < PRF < PRF+HA/β-TCP–700.

**4.5.2. Динаміка показників гострої фази.** Травматичне ушкодження тканин, в тому числі і кісткової, внаслідок системної дії прозапальних цитокінів супроводжується реакцією гострої фази, яка характеризується збільшенням концентрації в крові низки білків (С-реактивний, гаптоглобін,

амілоїдний білок,  $\alpha$ 2-макроглобулін) та зменшенням рівня альбуміну, що відбувається внаслідок посилення білоксинтезуючої функції печінки [290]. Травма також супроводжується гіперкоагуляційним синдромом, зумовленим як активацією внутрішнього шляху системи гемостазу, так і дією прозапальних цитокінів. Низкою попередніх робіт [42, 43, 291–293] доведено, що це все в цілому має суттєве клініко-патогенетичне значення за репаративного остеогенезу в тварин. Поряд з цим маловідомо про можливий вплив імплантованих тромбоцитарних концентратів на перебіг реакції гострої фази за репаративного остеогенезу.

Вміст загального білка у сироватці крові відображає в цілому стан білоксинтезуючої функції печінки в організмі ссавців, а також баланс процесів катаболізму і анаболізму. Протягом усього терміну дослідження (табл. 4.5) його рівень не виходив за межі фізіологічної норми (54–80 г/л). Однак його зміни виявилися досить динамічними. На 3-ю добу достовірно зниження концентрації загального білка виявилось у контрольній, 3-й та 4-й дослідній групах – в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових тварин за відсутньої достовірності між цими групами. Хоча в 1-й дослідній групі (PRP) рівень загального білка не змінився, а в 5-й він зменшився в середньому лише на 3,19 г/л до  $65,09 \pm 0,75$  г/л ( $p < 0,05$ ). З 7-ої доби відбулося підвищення концентрації загального білка в сироватці крові тварин усіх груп, але його ступінь виявився різним. Так, у 1-й, 2-й, 3-й та 4-й дослідних групах вона була більшою у 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), ніж у контрольній групі та в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ) за показник клінічно здорових тварин. Проте у 5-й дослідній групі спостерігали лише тенденцію до її підвищення, внаслідок чого вона не мала достовірної різниці з показником здорових кролів.

На 14-ту добу рівень загального білка в контрольній групі підвищився до показника клінічно здорових кролів і залишався на цьому рівні до 42-ої доби дослідження. Натомість у 5-й дослідній групі вміст загального білка у сироватці крові кролів із остеозаміщенням на 42-гу добу досяг пікового значення  $76,91 \pm 2,04$  г/л. Приблизно такого ж рівня (в середньому  $74,16$ –

Таблиця 4.5

## Динаміка біохімічних показників у сироватці та плазмі крові за імплантації у кісткові дефекти PRP-матеріалів

Терміни дослідження, доба	Групи тварин	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Гаптоглобін, г/л	НО, мкмоль/л	Розчинний фібрин, мг%	Антитромбін III, %
	Клінічно здорові (n=25)	68,28±1,14	35,3±0,29	1,59±0,02	28,4±0,38	0,14±0,01	95,57±0,84
3-я (n=12 у кожній групі)	Контрольна	61,23±1,52***	38,44±0,24***	1,92±0,01***	35,96±0,55***	11,78±0,96***	83,38±0,60***
	1-а, PRP	68,03±1,33**	37,45±0,21****	1,84±0,04***	32,99±0,59****	10,18±0,64***	85,67±0,80****
	2-а, PRF	63,96±0,69**	37,30±0,29****	2,06±0,24	46,80±1,05****	13,26±0,74***	88,50±1,70****
	3-я, I-PRF	61,67±0,90***	38,93±0,15***	2,03±0,02****	39,51±0,56****	11,37±0,59***	87,57±0,84****
	4-а, Ксен. PRF	62,12±1,21***	37,10±0,23****	1,91±0,02***	34,42±0,75***	10,15±0,34***	84,20±0,57***
5-а, PRF+HA/β-TCP-700	65,09±0,75*	36,89±0,27****	1,90±0,01***	35,25±0,58***	12,12±0,93***	88,13±0,92****	
7-а (n=12 у кожній групі)	Контрольна	62,01±0,56***	40,53±0,28***	1,43±0,01***	40,29±0,90***	12,96±0,86***	97,71±2,16
	1-а, PRP	75,90±0,81****	39,45±0,24****	1,67±0,02****	31,75±0,40****	12,01±0,59***	94,17±1,08
	2-а, PRF	76,10±0,73****	39,11±0,15****	1,51±0,01****	37,14±0,54****	13,64±1,35***	96,14±1,55
	3-я, I-PRF	74,16±0,67****	40,28±0,18***	1,64±0,02***	37,39±0,33****	11,51±0,64***	95,43±0,75
	4-а, Ксен. PRF	75,20±0,95****	39,80±0,24***	1,56±0,03***	32,38±0,81****	12,01±0,95***	94,25±1,07
5-а, PRF+HA/β-TCP-700	66,33±0,31***	39,78±0,26***	1,40±0,02***	30,31±0,19****	14,39±0,65***	98,5±2,07	
14-а	Контрольна	68,08±0,84	37,06±0,38***	2,10±0,07***	42,96±0,69***	5,08±0,87***	99,8±1,93*
	1-а, PRP	71,40±1,37	36,68±0,20***	2,35±0,05****	39,06±0,59****	4,76±0,55***	98,60±0,81*

Продовження таблиці 4.5

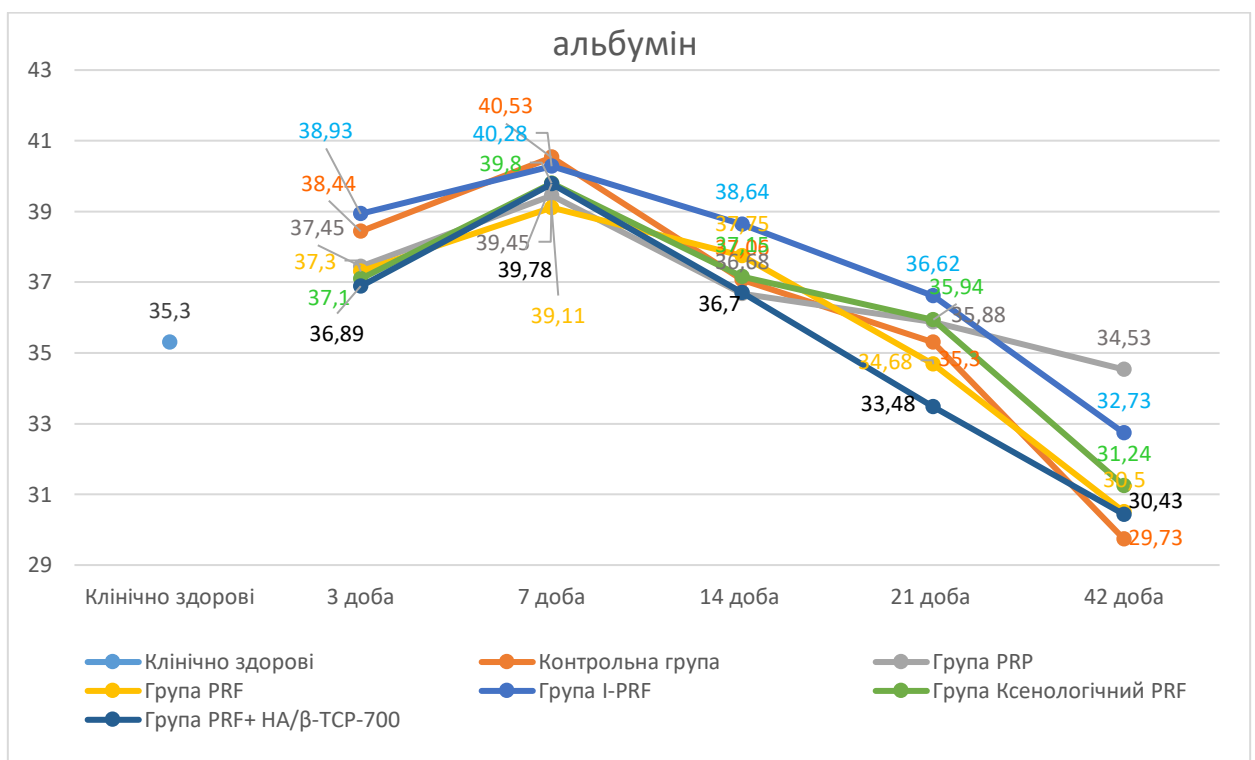
(n=12 у кожній групі)	2-а, PRF	71,1±0,69**	37,75±0,15***	1,82±0,01****	34,23±0,72****	4,67±0,47***	96,33±2,19
	3-я, I-PRF	71,46±0,73**	38,64±0,31****	2,20±0,04***	38,84±0,99****	5,74±0,76***	99,60±1,12**
	4-а, Ксен. PRF	69,85±0,65	37,15±0,27***	2,00±0,05***	35,21±0,86****	5,36±0,62***	96,8±1,15
	5-а, PRF+HA/β-TCP-700	72,25±0,79**	36,70±0,13***	1,91±0,04***	39,25±0,47****	5,76±0,63***	97,30±1,71
21-а (n=8 у кожній групі)	Контрольна	68,34±0,41	35,3±0,17	1,87±0,24	31,26±0,45***	3,66±0,38***	93,40±1,37
	1-а, PRP	73,93±1,51**	35,88±0,11*	1,60±0,08	34,03±0,86***	3,97±0,80***	96,25±1,10
	2-а, PRF	71,87±0,40****	34,68±0,21*	1,40±0,02***	37,68±0,66****	4,11±0,33***	93,60±0,81
	3-я, I-PRF	70,70±0,51**	36,62±0,14****	1,70±0,02***	41,63±0,64****	2,28±0,40***	93,80±1,16
	4-а, Ксен. PRF	69,50±0,75	35,94±0,11**	1,83±0,03***	33,01±0,56***	3,15±0,52***	94,20±0,95
5-а, PRF+HA/β-TCP-700	72,60±0,58****	33,48±0,19****	1,47±0,03**	34,52±0,81****	2,70±0,44***	94,80±1,50	
42-а (n=4 у кожній групі)	Контрольна	68,57±0,09	29,73±0,69***	1,04±0,05***	26,53±0,72*	1,82±0,36***	93,00±3,21
	1-а, PRP	75,50±1,60**	34,53±0,33***	1,05±0,07***	32,70±1,99*	1,68±0,49**	90,67±0,88***
	2-а, PRF	72,67±0,76**	30,50±0,38***	0,86±0,10***	38,20±1,72****	2,20±0,13***	95,33±0,88
	3-я, I-PRF	70,47±0,61*	32,73±0,38****	0,97±0,09***	30,80±1,39*	1,33±0,38**	92,33±0,67**
	4-а, Ксен. PRF	71,80±0,74**	31,24±0,29***	0,95±0,06***	33,78±0,95****	1,85±0,47**	92,51±1,24*
5-а, PRF+HA/β-TCP-700	76,91±2,04**	30,43±0,45***	0,78±0,09***	39,83±3,42**	1,89±0,12***	92,65±1,45	

**Примітка.** Значення р: \* – <0.05, \*\* – <0.01, \*\*\* – <0,001 достовірні відмінності показників, порівняно з контрольною групою у відповідний термін дослідження; • – <0.05, •• – <0.01, ••• – <0,001, порівняно з показниками клінічно здорових тварин.



75,9 г/л) він досягав у решти дослідних груп на 7-му добу, а далі утримувався вище 70 г/л. Тобто в цілому за використання імплантаційних PRP – матеріалів впродовж репаративного остеогенезу має місце позитивна динаміка рівня в сироватці крові загального білка.

Як і концентрація в сироватці крові загального білка, вміст альбуміну (рис. 4.58) за фізіологічної норми коливається в досить широких межах 27–50 г/л і в усі терміни дослідження його показники в контрольній і дослідних групах знаходилися в цих межах. У ранній посттравматичний період відмічали



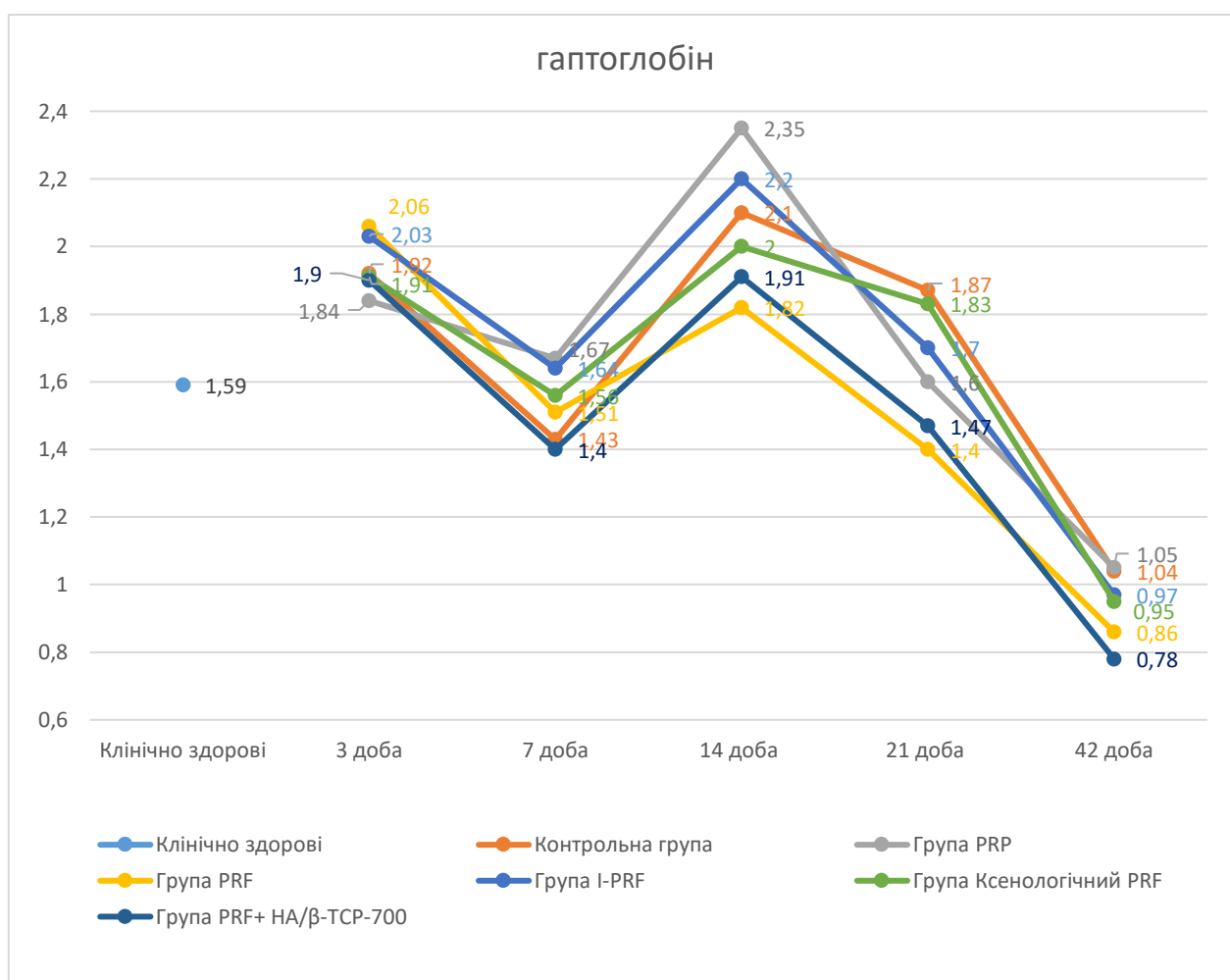
**Рис. 4.58. Динаміка вмісту альбуміну в сироватці крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

невелике, в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ), підвищення його концентрації, порівняно з клінічно здоровими тваринами, в усіх групах, яке утрималося до 14-ї доби включно. Далі відмічали деяке зменшення рівня альбуміну в усіх групах, що навіть зумовило менші його показники, ніж у клінічно здорових тварин, на 42-гу добу. Хоча в ряді випадків між групами встановлена достовірна різниця,

але коливання складали менше 5 г/л, що за широких фізіологічних меж концентрації в сироватці крові альбуміна не має суттєвого значення.

Тобто підвищення концентрації альбуміну в ранній посттравматичний період, а потім деяке її зменшення засвідчує адаптивний характер таких змін в умовах репаративного остеогенезу в зв'язку з транспортною функцією цього білка.

Серед низки білків гострої фази одним із провідних у кролів вважається гаптоглобін [294, 295]. У період розгортання запально-резорбтивної стадії репаративного остеогенезу, на 3-ю добу після моделювання кісткових дефектів та імплантації в них PRP – матеріалів (рис. 4.59) його рівень у



**Рис. 4.59. Динаміка вмісту гаптоглобіну в сироватці крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

сироватці крові кролів досить суттєво підвищувався, в переважній більшості груп у 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), а в 2-й і 3-й дослідних групах – в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ). Хоча у наступний термін дослідження, на 7-му добу, рівень гаптоглобіну нормалізувався у 3-й і 4-й дослідних групах, а у контрольній і 5-й дослідній навіть виявився в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ) меншим за показник клінічно здорових тварин.

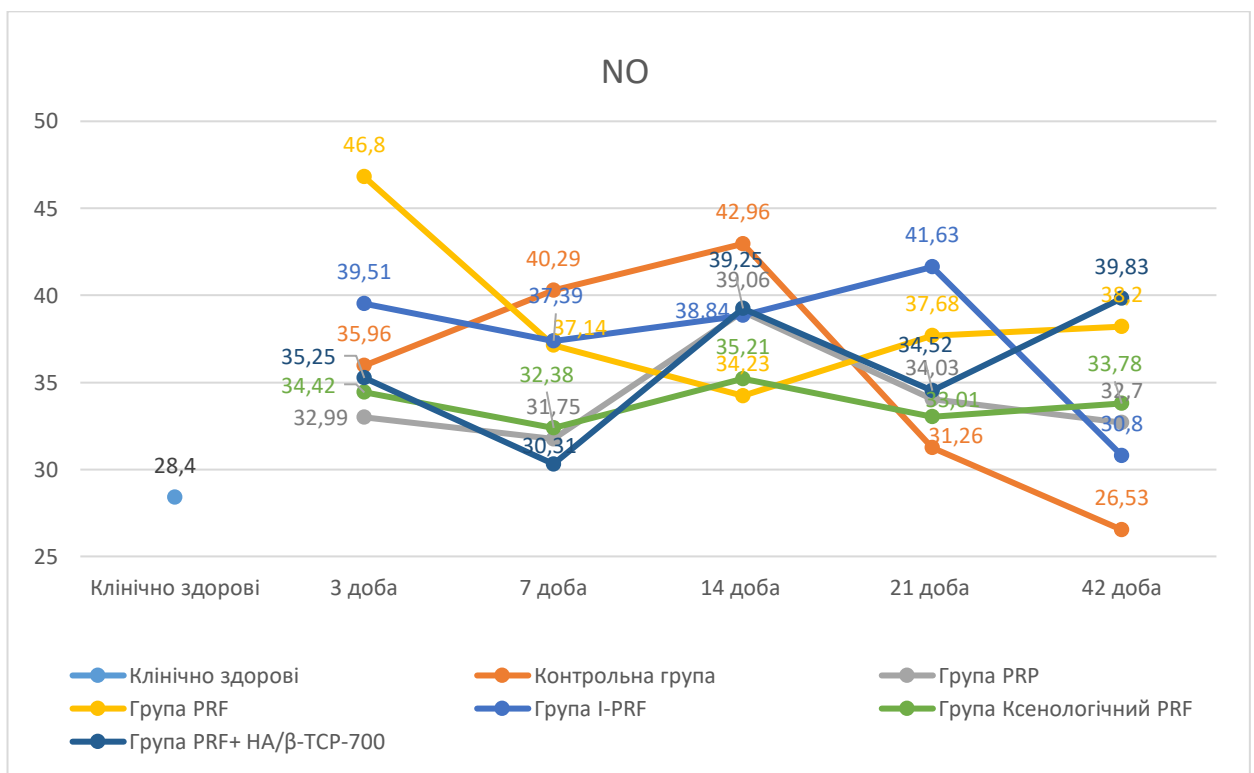
Проте на 14-ту добу зареєстровано нову хвилю гаптоглобінемії. При цьому, якщо в контрольній групі, 1-й, 3-й та 4-й дослідних рівень гаптоглобіну виявився більшим, ніж у клінічно здорових тварин, у 1,3–1,5 раза ( $p < 0,001$ ), то у 2-й і 5-й, з використанням PRF, тільки в 1,1–1,2 раза ( $p < 0,001$ ) за достовірної різниці з іншими групами.

В наступному рівень гаптоглобіну в усіх групах до 42-ої доби динамічно зменшувався. Так, на 21-шу добу в 2-й і 5-й дослідних групах він виявився навіть меншим за показник ( $1,59 \pm 0,02$ ) клінічно здорових тварин –  $1,4 \pm 0,02$  г/л та  $1,47 \pm 0,03$  г/л ( $p < 0,01$ ), відповідно, тоді як у контрольній та групі з використанням ксенологічного PRF все ще залишався підвищеним у 1,2 раза ( $p < 0,001$ ). На 42-гу добу концентрація гаптоглобіну в усіх групах різко зменшилася нижче показника клінічно здорових кролів, що характерно для групи білків гострої фази в період ремісії.

Отже, реакція гострої фази за репаративного остеогенезу в кролів у зв'язку з кістковими дефектами характеризується двохфазною гаптоглобінемією на 3-ю і 14-ту добу, що спочатку відображає формування запально-резорбтивної стадії, а потім молекулярно-клітинні механізми заміщення сполучно-тканинного і хрящового мозоля кістковою тканиною, які в обох випадках регулюються прозапальними цитокінами [204, 296]. Оскільки рівень гаптоглобінемії опосередковано відображає інтенсивність цитокінемії, яка в її другу фазу залежить якісних і кількісних характеристик первинного мозоля, то на підставі цього імпантовані форми PRF (2-а і 5-а групи) забезпечують більш оптимальний перебіг репаративного остеогенезу.

Відновлення васкуляризації є важливим елементом репаративного остеогенезу. Ангіогенні та остеогенні процеси тісно пов'язані між собою, оскільки, в першу чергу, ранній неоангіогенез забезпечує достатній рівень кисню в регенераті, який необхідний для синтезу кісткового колагену II типу. Первинним етапом неоангіогенезу є формування ендотеліальної реакції, активність якої відображає рівень у сироватці крові NO.

Встановлені динамічні зміни його концентрації мали певні закономірності в контрольній і дослідних групах тварин (рис. 4.60). При цьому, в першу чергу, звертає на себе увагу виражена фазність у динаміці змін концентрації NO в сироватці крові. Перша фаза припала на 3-ю добу і характеризувалася підвищенням рівня NO в усіх групах, що може бути



**Рис. 4.60. Динаміка вмісту оксиду азоту у сироватці крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

зумовлено одночасною активацією як лейкоцитарної NO – синтази, так і ендотеліальної NO – синтази.

Найменшим рівень підвищення вмісту в крові NO виявився за імплантації PRP та ксенологічного PRF – в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), найвищим – у 2-й (PRF) і 3-й (i-PRF) – в 1,6 та 1,4 раза ( $p < 0,001$ ) відповідно, та дещо нижчим у контрольній і 5-й дослідній групі – збільшення в 1,3 та 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно.

Якщо в дослідних групах на 7-му добу репаративного остеогенезу рівень NO дещо зменшився, то в контрольній він продовжував збільшуватися і був вищим у 1,4 раза ( $p < 0,001$ ), ніж у клінічно здорових кролів. Причому в цей період серед дослідних груп найвищим рівень NO виявився в 2-й і 3-й групах.

У період 14-ї доби у контрольній групі концентрація NO досягала піку –  $42,96 \pm 0,69$  мкмоль/л, а у 5-й дослідній –  $39,25 \pm 0,47$  мкмоль/л, що було в 1,5 та 1,4 раза ( $p < 0,001$ ) більше, ніж у клінічно здорових тварин. Також пікового значення рівень NO досягав у 1-й дослідній групі –  $39,06 \pm 0,59$  мкмоль/л, а у 3-й групі він продовжував наростати  $38,84 \pm 0,99$  мкмоль/л.

В свою чергу 21-а доба характеризувалася помірним підвищенням рівня NO в контрольній, 1-й, 4-й і 5-й дослідних групах – у межах 31,26–34,52 мкмоль/л, тоді як у 2-й та 3-й дослідних групах він досягав нового піку –  $37,68 \pm 0,66$  та  $41,63 \pm 0,64$  мкмоль/л, відповідно.

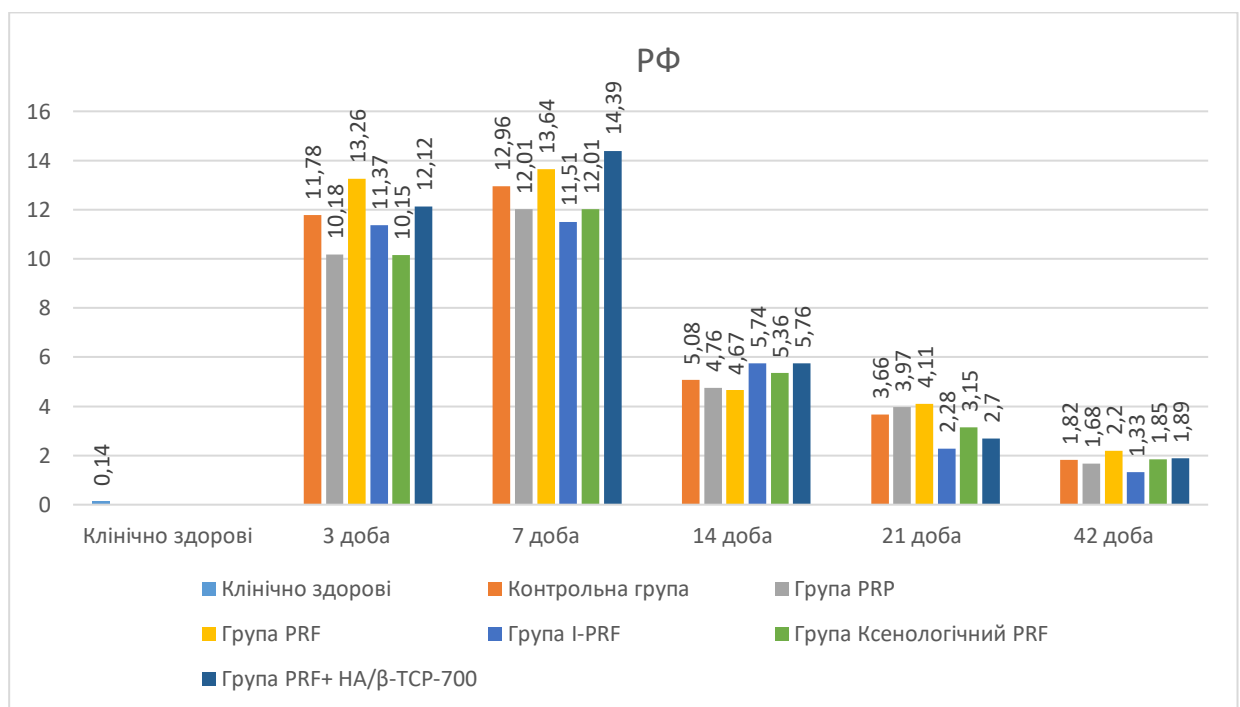
Нарешті, на 42-гу добу в 5-й дослідній групі зареєстрували другий за весь термін дослідження пік умісту NO в сироватці крові –  $39,83 \pm 3,42$  мкмоль/л, що було в 1,4–1,5 раза ( $p < 0,01$ ) більше, ніж у контрольній групі та у клінічно здорових кролів. При цьому у 2-й дослідній групі він залишався, як і попередню добу, високим  $38,2 \pm 1,72$  мкмоль/л, тоді як у решти дослідних груп помірно підвищеним – у межах 30,8–33,78 мкмоль/л.

Отже, загоєння кісткового дефекту під кров'яним згустком супроводжується перманентним підвищенням рівня в крові NO з досягненням пікового значення на 14-ту добу репаративного остеогенезу з наступним зниженням та помірно збільшеною концентрацією на 21-шу добу. За імплантації PRP має місце помірне його підвищення впродовж усіх термінів дослідження з високим піковим значенням на 14-ту добу. За імплантації

аутологічного PRF та і-PRF встановлені високі рівні NO перманентного характеру з двохфазними піками на 3-ю добу та 21-шу і 42-гу, відповідно, тоді як за ксенологічного PRF – перманентне помірне підвищення.

Натомість остеозаміщення кісткових дефектів у 5-й дослідній групі (PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700) супроводжувалося двома піками рівня NO – на 14-ту та 42-гу добу. Оскільки за рештою клініко-патогенетичних критерії (клініко-патоморфологічних, гістоморфологічних і гематологічних) в зазначені терміни запальний компонент був відсутній, то високий рівень NO зумовлювався ендотеліальною NO – синтазою, що в перший термін свідчило про інтенсивний неоангіогенез, а у другий – про ремоделювання кісткового регенерату.

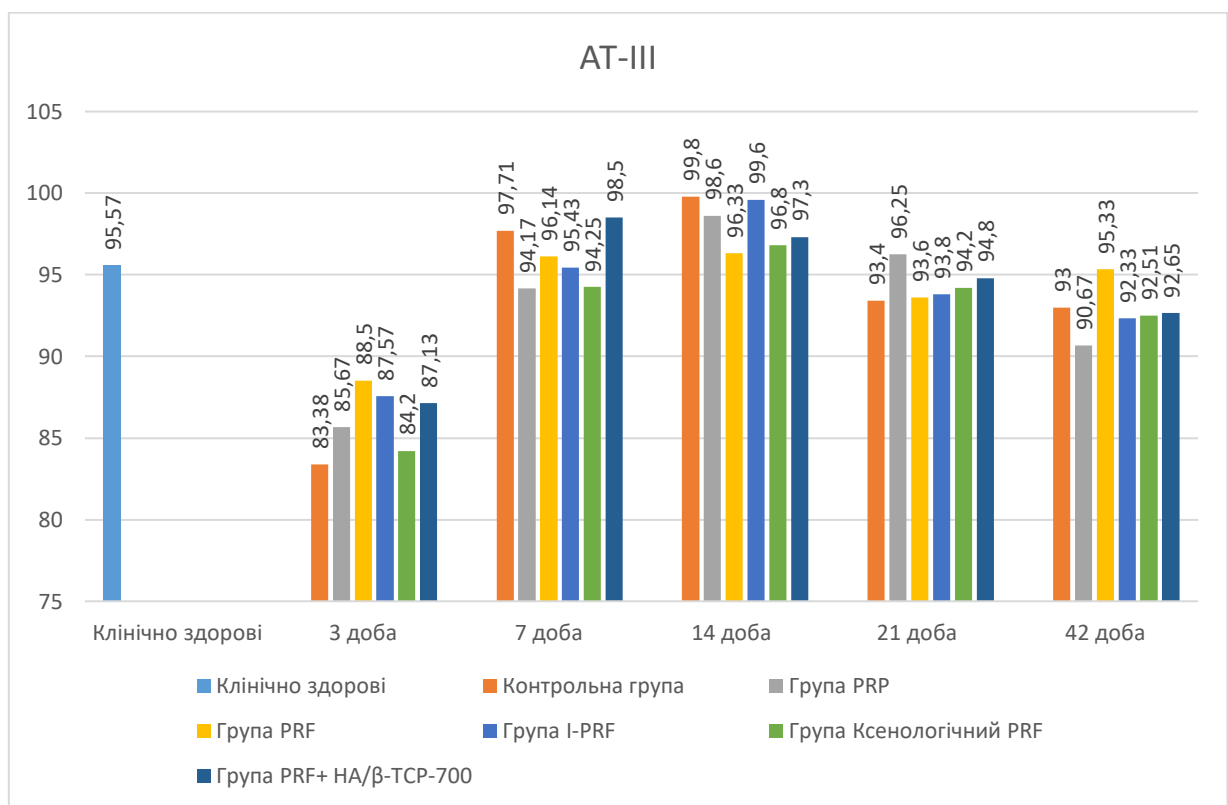
Притаманний для перших стадій репаративного остеогенезу гіперкоагуляційний синдром, маркером якого є розчинний фібрин (РФ), має місце у контрольній і дослідних групах. При цьому його концентрація в плазмі крові була високою (в нормі визначаються лише сліди РФ) (рис. 4.61)



**Рис. 4.61. Динаміка вмісту розчинного фібрину в плазмі крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

( $p < 0,001$ ) з наступним динамічним зниженням, протягом перших 14-и діб без суттєвої різниці між групами, яка надалі динамічно зменшувалася. Лише на 21-шу добу в 3-й (i-PRF) групі дослідних тварин концентрація РФ виявилася у 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) меншою, як свідчення динамічної нормалізації гемостазологічної реакції.

Заразом активність у групах основного природного антикоагулянта – антитромбіну-III (АТ-III), суттєво не змінювалася (рис. 4.62). Її достовірне зменшення на 3-ю добу посттравматичного періоду в усіх дослідних групах



**Рис. 4.62. Динаміка вмісту антитромбіну-III в плазмі крові кролів за імплантації різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

корелювало з масованою тромбінемією (підвищення рівні РФ). При цьому слід взяти до уваги, що критичною межею потенційного тромбоутворення є активність АТ-III нижча за 85 %. Тобто в умовах загоєння кісткової травми завжди існує потенційний ризик тромбоутворення, оскільки на 3-ю добу в

контрольній групі її рівень становив  $83,38 \pm 0,6$  %, який усувається за імплантації у кістковий дефект PRF – матеріалів.

Остеозаміщення вважають одним з перспективних напрямів у регенеративній медицині, проте часто зустрічаються випадки за яких необхідно проводити корекцію регенеративних властивостей, оскільки регенеративний потенціал може бути суттєво зниженим.

Низка відомих остеозаміщувальних матеріалів володіють переважно остеоіндуктивними властивостями, а дослідження стосовно застосування PRP-речовин та їх клініко-патогенетичне обґрунтування залишається мало вивченим у ветеринарній ортопедії. Припускають, що різні типи PRP-матеріалів 1-го чи 2-го покоління володіють різними властивостями.

У зв'язку з цим вперше у ветеринарній медицині проведено дослідження з моніторингу впливу різних типів тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з гідроксиапатитом і  $\beta$ -трикальційфосфатом для встановлення їх остеоіндуктивних властивостей та вплив на регенерацію кісткової тканини.

За комплексом клініко-рентгенологічних характеристик, макро- і гістоморфологічних та біохімічних досліджень матеріалом з найбільш вираженими остеоіндуктивними властивостями виявився фібрин, збагачений тромбоцитами та його комбінація із гідроксиапатитом і  $\beta$ -трикальційфосфатом, дія якого, ймовірно, зумовлена впливом факторів росту та терміном їх випуску з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів.

Таким чином остеоімплантація фібрину, збагаченого тромбоцитами у модельні дірчасті дефекти кісткової тканини кролів за гістоморфологічними критеріями оптимізує консолідацію переломів у компактній кістковій тканині за самостійного використання PRF у 1,3 раза ( $p < 0,001$ ), за комбінованого поєднання PRF+HA/ $\beta$ -TSP-700 у 1,4 раза ( $p < 0,001$ ), а в губчастій у 1,3 раза ( $p < 0,001$ ).



## РОЗДІЛ 5

### КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ PRP- ТЕХНОЛОГІЙ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЙ З КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНОЮ КЕРАМІКОЮ У ЛІКУВАННІ ПЕРЕЛОМІВ ДОВГИХ ТРУБЧАСТИХ КІСТОК У СОБАК

У ветеринарній медицині, поки що коло клінічного застосування PRP-технологій досить обмежене і, головним чином, стосується проблем реконструкції зубних альвеол за одонтопатології [62, 85, 86, 222–224] та хвороб суглобів у коней і собак [244, 245, 251], а їх обґрунтуванню за травм кісток присвячені лише поодинокі роботи [5, 252, 253].

Попередньо (див. розд. 4) доведено суттєве підвищення остеointegraційних характеристик кальцій-фосфатної кераміки за остеозаміщення у кролів під впливом I-PRF та PRF, які індукують остеогенні процеси, що оптимізує репаративний остеогенез і стало підґрунтям для клінічно-експериментального обґрунтування їх застосування за спонтанних осколкових і неосколкових переломів діафізів довгих трубчастих кісток у собак.

Як зазначено вище (див. розд. 2) у контрольній групі собак з осколковими (n=5) та безосколковими переломами (n=5) проводили лише екстракортикальний остеосинтез, у першій дослідній групі у тварин з осколковими (n=5) переломами додатково між кістковими уламками (об'єм дефекту  $1,3 \pm 0,07 \text{ см}^3$ ) вносили PRF та I-PRF за неосколкових (n=5), а у другій дослідній групі виконували остеозаміщення за осколкових переломів з об'ємом дефекту  $2,01 \pm 0,09 \text{ см}^3$  (n=10) гідроксиапатитною керамікою в комбінації з PRF. Рентгенологічна картина зазначених переломів представлена на рис. 5.1, а їх накісткового остеосинтезу на рис. 5.2.

#### **5.1. Динаміка клініко-рентгенологічних критеріїв**

У тварин усіх груп через 24 години після остеосинтезу операційні рани

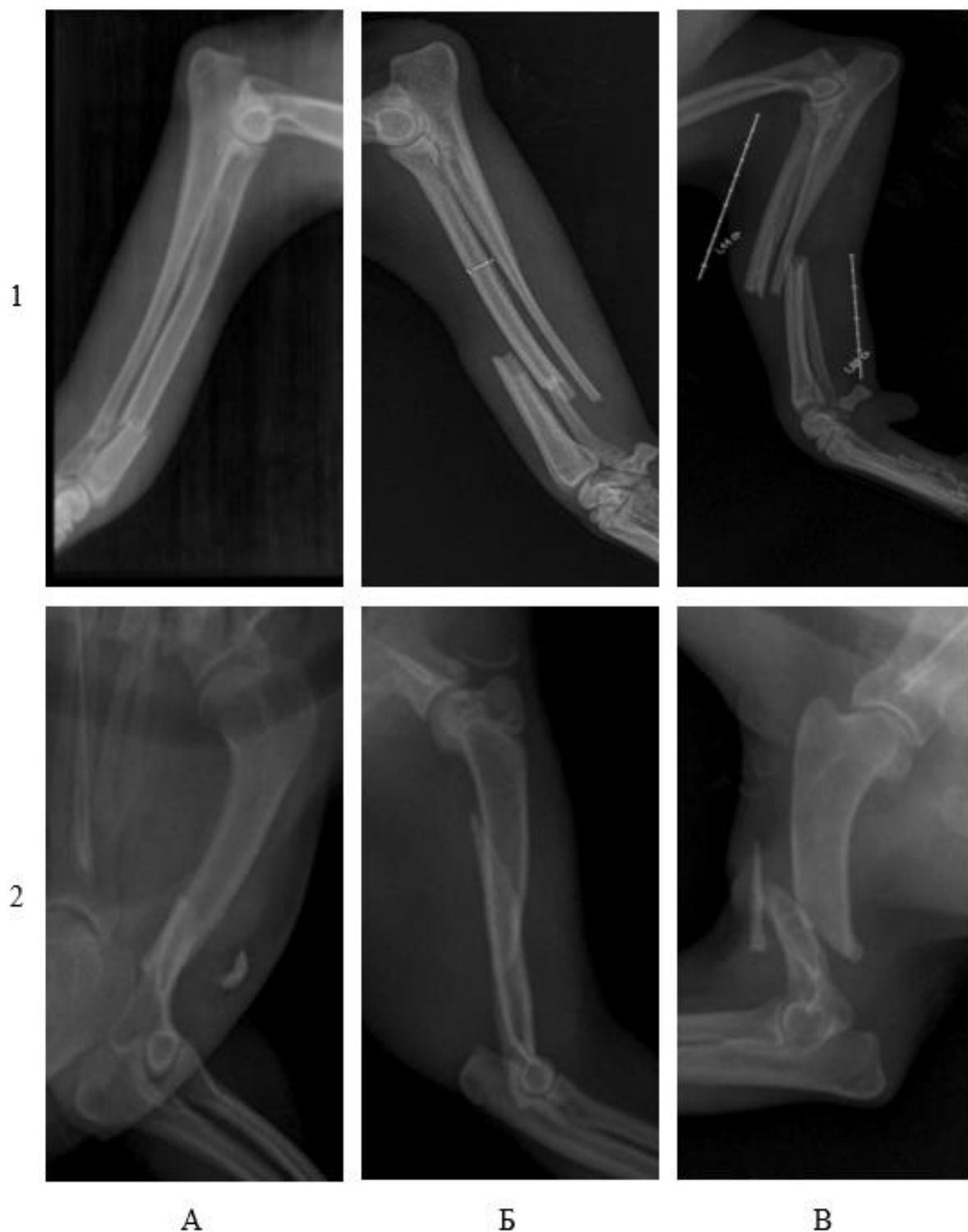


Рис. 5.1. Рентгенограми плечови х кісток та передпліччя собак до остеосинтезу: А – контрольна група (А1 – переломи без осколків, А2 –осколкові переломи); Б – перша дослідна група (Б1 – переломи без осколків, Б2 – осколкові переломи); В – друга дослідна група (В1, В2 – осколкові переломи)

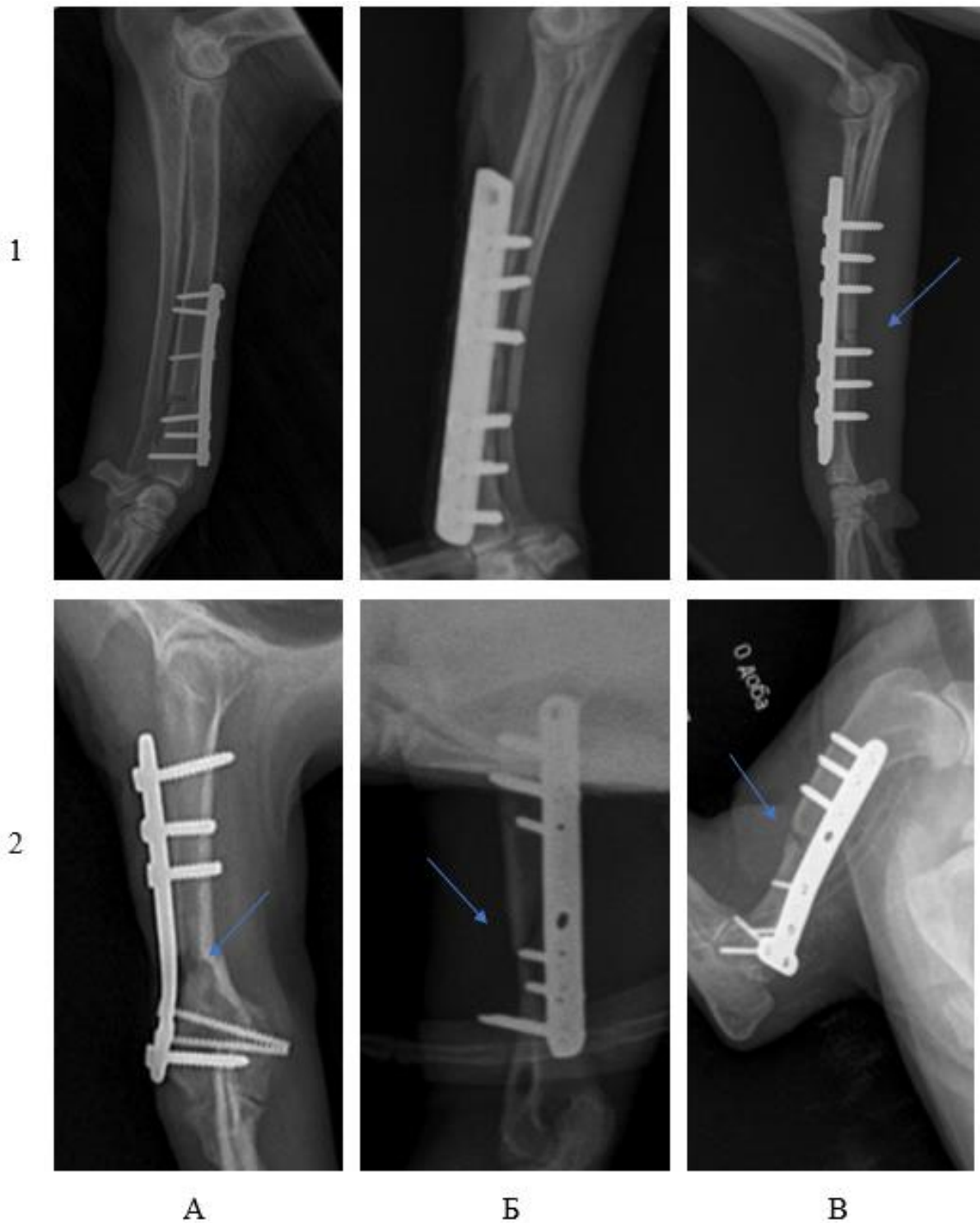


Рис. 5.2. Рентгенограми плечових кісток та передпліччя собак після остеосинтезу: А – контрольна група (А2 – стрілкою вказано незаповнений кістковий дефект); Б – перша дослідна група (Б2 – стрілкою вказано кістковий дефект, заповнений PRF); В – друга дослідна група (В1, В2 – стрілкою вказано кістковий дефект заміщений PRF+HA/ $\beta$ -TCP-700)

були впродовж 3–4-х діб з ознаками помірної запальної реакції, підвищеною місцевою температурою, набряком тканин та виділенням серозного ексудату з дренажа або із країв рани. Через 7–10 діб після остеосинтезу краї ран були з'єднані сполучно-тканинною спайкою у стані епітелізації, що свідчило про необхідність зняття швів. При цьому клінічна картина зменшення інтенсивності ранового запалення в дослідних групах була в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) більшою, ніж у контрольній групі (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

### Клінічні критерії динаміки консолідації фрактур кісток у собак

Клінічні критерії	Контрольна група (n=10), доба	Перша дослідна група (n=10), доба	Друга дослідна група (n=10), доба
зникнення набряку тканин	7,5±0,5 (5–10)	6,2±0,33* (5–8)	6,3±0,23* (5–7)
початок опирання на травмовану кінцівку	12,8±0,51 (11–15)	11,2±0,39* (10–13)	9,6±0,27***●● (9–11)
повне відновлення функції кінцівки	36,6±1,33 (28–42)	29,4±0,83*** (26–35)	25,9±0,7***●● (22–29)
консолідація перелому	63,0±0,89 (60–67)	48,0±1,1*** (45–52)	42,8±0,95***●● (40–48)

**Примітка.** Значення  $p$ : \* –  $< 0,05$ ; \*\* –  $< 0,01$ ; \*\*\* –  $< 0,001$ , порівняно з контрольною групою; значення  $p$ : ● –  $< 0,05$ ; ●● –  $< 0,01$ ; ●●● –  $< 0,001$ , порівняно з тваринами першої дослідної групи.

У тварин контрольної групи період до початку опирання на травмовану кінцівку після остеосинтезу був найдовший і складав 12,8±0,51 добу, тоді як у 1-й дослідній він виявився в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ), а в 2-й дослідній групі в 1,3 раза

( $p < 0,001$ ) коротшим за різниці в 1,2 раза ( $p < 0,01$ ) між ними. Повне відновлення функції кінцівки відбувалося у тварин контрольної групи в середньому на  $36,6 \pm 1,33$  добу, в той час як у дослідних групах відповідно в 1,2 та в 1,4 ( $p < 0,001$ ) швидше за різниці в 1,1 раза ( $p < 0,01$ ) між ними. В свою чергу рентгенологічно встановлена консолідація переломів у контрольній групі становила  $63,0 \pm 0,89$  доби, а в дослідних відповідно в 1,3 та 1,5 ( $p < 0,001$ ) раза раніше за різниці в 1,1 раза ( $p < 0,01$ ) між ними.

Після встановлення пластин рентгенологічно (рис. 5.2) засвідчено репозицію уламків плечових, променеви́х та ліктьових кісток, а у 2-й дослідній групі (рис. 5.2. В1, В2) ледь візуалізувалися гранули НА/β-ТСР-700 у ділянці кісткового дефекту.

На 14-ту добу (рис. 5.3) в усіх групах місця дефектів ще візуалізувалися, а краї кісткових уламків були згладжені. Зокрема, у кістках передпліччя контрольної групи собак (рис. 5.3. А1) рентгенологічно встановлено незначну періостальну реакцію та явища остеорезорбції, які проявлялися зменшенням рентгенощільності, що відображало ступінь запально-резорбтивної стадії репаративного остеогенезу. У плечових кістках (рис. 5.3. А2.) цієї групи відмічали незначні пері- та ендоостальну реакції проксимальніше і дистальніше на деякій відстані від місця перелому.

При цьому в 1-й дослідній групі у променеви́х кістках (рис. 5.3. Б1) помірна періостальна реакція поширювалася в обидва боки від місця перелому з формуванням тіні остеїду, у плечових (рис. 5.3. Б2) переважною була ендоостальна реакція.

В цей же час у 2-й дослідній групі на 14-ту добу в ділянці передпліччя (рис. 5.3. В1) площа остеїду виявилася більшою, а пері- та ендоостальна реакції досить потужними у вигляді вогнищ різної рентгенощільності, що свідчило про інтенсивний перебіг остеогенних процесів. На рентгенограмах плечових кісток цієї групи (рис. 5.3. В2) остеїд мав вигляд хмароподібного утворення, ділянки остеосклерозу чергувалися з вогнищами остеопорозу.

На 21-у добу (рис. 5.4. А1) у тварин контрольної групи рентгенологічно



**Рис. 5.3. Рентгенограми плечових кісток та передпліччя собак на 14-ту добу репаративного остеогенезу:**

A1, A2 – контрольна; Б1, Б2 – перша дослідна група;

В1, В2 – друга дослідна група

чітко візуалізувалося місце дефекту кісток передпліччя. Проксимально та дистально від нього відмічали збільшення інтенсивності пері- та ендоостальної реакції та ділянки з підвищеною рентгенологічною щільністю, тоді як у плечових кістках (рис. 5.4. А2) відмічали зниження рентгенщільності і посилення остеорезорбції.

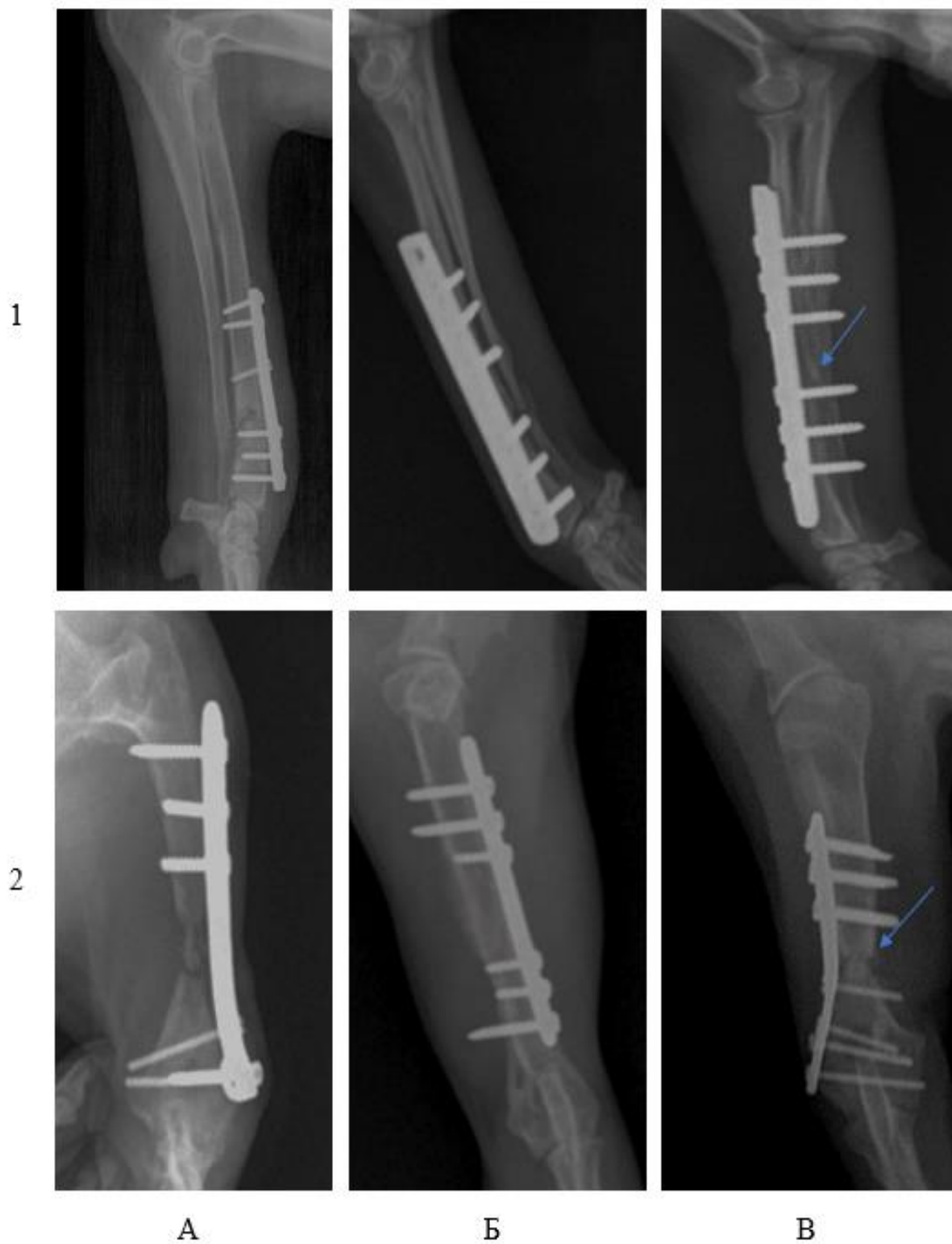
Натомість у 1-й дослідній групі в цей період у кістках передпліччя (рис. 5.4. Б1) спостерігали помірну періостальну реакцію, заповнене остеоїдом місце дефекту, а у плечових кістках регенерат був неоднорідним з ділянками різної рентгенощільності.

Водночас у тварин 2-ї дослідної групи на 21-шу добу відмічали у ділянках передпліччя і плечової кістки (рис. 5.4. В1, В2) потужну реакцію ендоосту з поширенням вище і нижче місця перелому з підвищеною рентгенощільністю місць остеозаміщення.

На 42-гу добу у кістках передпліччя контрольної групи (рис. 5.5. А1) все ще чітко візуалізувалося місце дефекту, навколо якого в зоні кістково-мозкового каналу відмічали ділянки однорідної підвищеної рентгенощільності. Періостальна реакція мала вигляд неоднорідного хмароподібного утворення, яке виступало над поверхнею ділянки кісткової травми. У плечових кістках (рис. 5.5. А2) відмічали потоншення коркового шару кістки та зменшення її рентгенощільності, чітко видиме місце дефекту.

У відповідний період у 1-й дослідній групі на кістках передпліччя і плечовій (рис. 5.5. Б1, Б2) місце дефекту виповнене кістковим регенератом високої щільності, а проксимально від місця кісткової травми відмічали реакцію періосту.

У 2-й дослідній групі у ділянці передпліччя (рис. 5.5. В1) кістковий регенерат мав однорідну рентгенщільність, а проксимально від кісткової травми відмічали зону ендо-періостальної реакції. У плечових кістках собак цієї групи (рис. 5.5. 2В) разом із кістковим регенератом дещо візуалізувалися залишки композитного матеріалу, які надавали йому неоднорідності, а дистально від нього зона ендоостальної реакції, що свідчило про перебіг



**Рис. 5.4. Рентгенограми плечових кісток та передпліччя собак на 21-шу добу репаративного остеогенезу:**

A1, A2 – контрольна; Б1, Б2 – перша дослідна група;

В1, В2 – друга дослідна група





**Рис. 5.5. Рентгенограми плечових кісток та передпліччя собак на 42-гу добу репаративного остеогенезу:**

А1, А2 – контрольна; Б1, Б2 – перша дослідна група;

В1, В2 – друга дослідна група

репаративного остеогенезу переважно у межах кісткової травми.

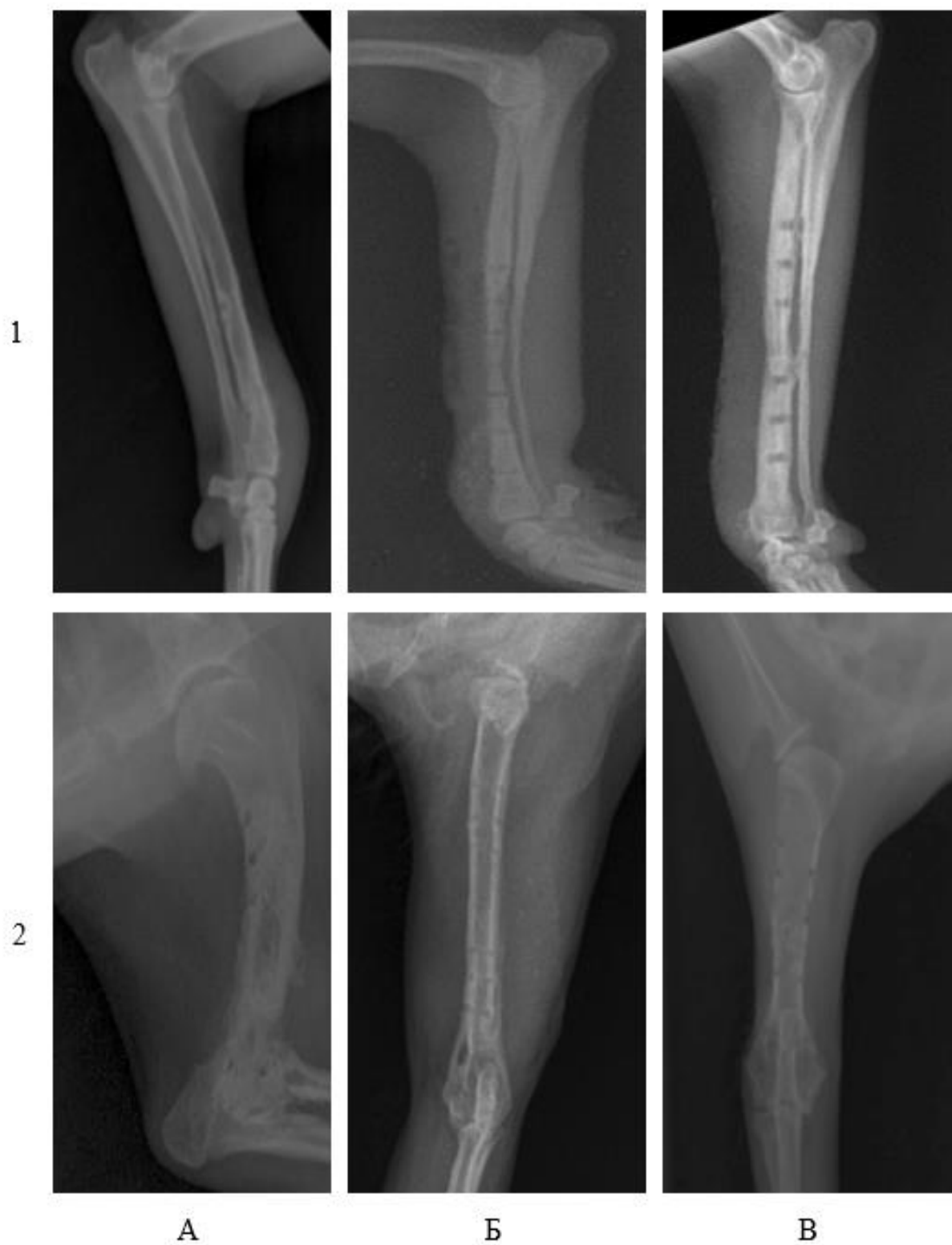
Після консолідації переломів проводили зняття пластин. Рентгенологічно на 60-ту добу в собак контрольної групи (рис. 5.6. А1, А2) у променевих і плечових кістках регенерат був неоднорідної щільності, грубосформованим з деяким остеолізом дистальної ділянки ліктьової кістки внаслідок тиску фіксаційних шурупів. Відмічали проліферацію ендоосту та періосту.

Натомість у собак 1-ї дослідної групи на 48-му добу (рис. 5.6. Б1) регенерат променевих кісток складав суцільну лінію з материнською кісткою, у плечових (рис. 5.6. Б2) відмічали потовщений ендоост і залишки розростань періосту. Водночас у 2-й дослідній групі (рис. 5.6. В1) на 42-гу добу відмічали незначні залишки періостальної реакції (рис. 5.6. В2), а регенерат променевих заповнював майже весь кістково-мозковий канал.

Таким чином, клініко-рентгенологічно підтверджено, що імплантація і- PRF чи PRF в міжуламкові простори за неосколкових та остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак скорочує запально-резорбтивну фазу репаративного остеогенезу та прискорює консолідацію таких переломів переважно за рахунок ендоостального остеогенезу.

## **5.2. Динаміка гематологічних та біохімічних показників**

Внаслідок кісткової травми одночасно виникає пошкодження і навколишніх м'яких тканин: м'язів, судин, сухожилків. При цьому порушується живлення пошкодженої ділянки із розвитком ендотоксикозу та ризиком інфікування травмованих тканин. Порушення цілісності періосту, ендоосту і кісткового мозку супроводжується кровотечею, яка запускає комплекс коагуляційних процесів, з формуванням фібринового згустку, що виконує роль біологічної матриці, яка крім з'єднання країв кісткових уламків, забезпечує процеси адгезії, міграції та проліферації клітин остеогенного ряду



**Рис. 5.6. Рентгенограми плечових кісток та передпліччя собак після зняття пластин: А – контрольна група (А1, А2 – на 60-ту добу );**  
Б – перша дослідна група (Б1, Б2 – на 50-ту добу);  
В – друга дослідна група (В1, В2 – на 45-ту добу)

[103–105]. Поряд з цим включаються локальні і системні механізми продукції медіаторів запалення, за дисбалансу яких відбуваються зміни гемопоезу, імунологічної реактивності та гемостазіологічної функції [289, 293]. Великий об'єм кісткової травми, особливо за наявності осколків, та м'яких тканин, втрата між ними судинного зв'язку зумовлюють зниження репаративного потенціалу кісткової тканини, а видалення гематоми під час проведення репозиції кісткових уламків і остеосинтезу лімітує роль первинної біологічної матриці в ініціації репаративного остеогенезу. На відміну від інших тканин, регенерація кісткової тканини, поряд із процесами запалення і проліферації, супроводжується динамічними змінами кісткового метаболізму, тому за визначення ефективності різних способів лікування переломів кісток виникає необхідність оцінки гематологічної реакції, змін біохімічних компонентів запальної реакції та маркерів кісткового метаболізму.

**5.2.1. Гематологічні показники.** Встановлено (табл. 5.2), що виникнення кісткової травми у собак супроводжується зменшенням у периферичній крові кількості еритроцитів в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ) та збільшенням в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ) умісту лейкоцитів, порівняно з показниками клінічно здорових тварин. Крім того, з'являється тенденція до підвищення концентрації гемоглобіну та вмісту тромбоцитів. Ці зміни, перш за все, ймовірно, пов'язані з утворенням крововиливу в зоні перелому, що за осколкових переломів досягає досить великих об'ємів, та продукцією медіаторів запального процесу.

В наступні терміни дослідження під час репаративного остеогенезу динаміка зазначених гематологічних показників мала певні відмінності в групах. Спочатку звертає на себе увагу динаміка кількості еритроцитів. Так, на 3-ю добу спостерігали її подальше зменшення у всіх групах, яка була в 1,3–1,4 раза ( $p < 0,001$ ) нижчою від показника клінічно здорових тварин за відсутності достовірної різниці між групами. Проте вже з 7-ї доби в дослідних групах за остеозаміщення намітилася тенденція до її підвищення, при цьому в 1-й дослідній групі вона навіть виявилася більшою в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ), ніж у

Таблиця 5.2

## Динаміка гематологічних показників за PRP-остеоімплантації у собак

Терміни дослідження, доба	Групи тварин	Еритроцити, Т/л	Лейкоцити, Г/л	Тромбоцити, Г/л	Гемоглобін, г/л
	Клінічно здорові (n=10)	5,9±0,16	9,38±0,25	324±31,87	127,8±4,04
	Після травми (n=30)	4,61±0,098***	10,42±0,396*	395±21,63	132,29±3,10
3-я	Контрольна, n=10	4,3±0,09***	15,4±0,84***	482±28,72**	115,8±4,93
	1-а дослідна група, n=10	4,5±0,16***	12,7±0,83**	447±25,2**	119,8±2,9
	2-а дослідна група, n=10	4,41±0,097***	14,7±0,92***	446±41,8*	118,1±4,42
7-а	Контрольна, n=10	4,36±0,09***	16,29±0,74***	496±36,76**	118,0±3,15
	1-а дослідна група, n=10	4,71±0,14***	13,95±0,77***	497±20,6***	129,2±1,45**
	2-а дослідна група, n=10	4,57±0,15***	13,6±1,12**	457±19,6**	123,0±4,03
14-а	Контрольна, n=10	4,5±0,12***	16,3±0,82***	518±21,44***	121,8±3,75
	1-а дослідна група, n=10	4,88±0,19***	10,6±0,56***	497±31,2***	132,7±1,86*
	2-а дослідна група, n=10	4,87±0,11*****	11,1±0,8***	418±13,77***	129,8±3,05
21-а	Контрольна, n=10	4,59±0,07***	12,65±1,03**	444±21,95**	131,6±7,87
	1-а дослідна група, n=10	5,1±0,18**	10,06±0,11*	441±23,02**	135,5±3,18
	2-а дослідна група, n=10	5,13±0,12**	9,2±0,45**	408±19,44*	136,3±3,8
42-а	Контрольна, n=10	4,79±0,06***	10,7±0,68	435±24,98*	126,9±3,39
	1-а дослідна група, n=10	5,2±0,18**	8,92±0,18*	447±35,08*	137,2±4,08
	2-а дослідна група, n=10	5,1±0,13**	8,6±0,35*	453±36,5*	134,3±2,47

**Примітка.** Значення p: \* – <0,05, \*\* – <0,01, \*\*\* – <0,001, порівняно з контрольною групою; • – <0,05, \*\* – <0,01, \*\*\* – <0,001, порівняно з клінічно здоровими собаками.

контрольній. Надалі кількість еритроцитів поступово відновлювалася, що в дослідних групах відбувалося більш динамічно. У собак дослідних груп кількість еритроцитів була більшою в 1,1 раза ( $p < 0,05-0,01$ ), ніж у контрольних, і вже на 21-шу добу досягала нижньої межі загальновизнаної фізіологічної норми (5–8,5 Т/л).

Вплив еритроцитопенії на репаративний остеогенез, зокрема її тривалість, може мати негативний наслідок, оскільки забезпечення тканин киснем відіграє одну із ключових ролей у клітинній диференціації та продукції колагену I типу [297, 298]. Тобто, за остеозаміщення кісткових дефектів відбувається зменшення прояву посттравматичної анемії, яка усувається на 21-шу добу репаративного остеогенезу.

Поряд з цим, зміни концентрації гемоглобіну в крові відбувалися в межах фізіологічної норми (110–170 г/л), а у тварин дослідних груп вона виявилася навіть незначно вищою. Так, у 1-й дослідній групі на 7-му та 14-ту добу його вміст у крові був вищим в 1,1 раза ( $p < 0,05-0,01$ ) за показник тварин контрольної групи.

Після проведення остеосинтезу та остеозаміщення в усіх групах набував розвитку лейкоцитоз (рис. 5.7). На 3-ю добу в дослідних групах, порівняно з



Рис. 5.7. Динаміка вмісту лейкоцитів у крові собак за імплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою

клінічно здоровими тваринами, кількість лейкоцитів збільшувалася в 1,4–1,6

раза ( $p < 0,01-0,001$ ), а у контрольній в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) за достовірної різниці із 1-ю дослідною групою, у якій вона була меншою в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). При чому пік лейкоцитозу в контрольній групі –  $16,3 \pm 0,82$  Г/л, утримувався впродовж 7–14-ої діб. Водночас у дослідних групах вже на 14-ту добу вміст у крові лейкоцитів динамічно знижувався і в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) був меншим, порівняно з показником контрольної групи. Далі, на 14-ту добу рівень лейкоцитів у дослідних групах не мав достовірної різниці з показником здорових тварин, тоді як у контрольній – тільки на 42-гу добу.

Таким чином, лейкоцитарна реакція в контрольній групі виявилася подовженою в часі, порівняно з тваринами дослідних груп, у яких її інтенсивність та тривалість виявилися суттєво меншими.

Зміни кількості тромбоцитів у контрольній і дослідних групах також відбувалися у межах фізіологічної норми (220–550 Г/л), хоча в усіх групах помірний фізіологічний тромбоцитоз достовірно мав місце впродовж всього періоду спостережень. Проте у період 14-ї доби у 2-й дослідній групі кількість тромбоцитів виявилася меншою в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), ніж у контрольній. Ймовірно, така тромбоцитарна реакція у всіх групах зумовлена власне впливом підвищеної концентрації факторів росту чи цитокінів на тромбopoетин, який прискорює трансформацію мегакаріоцитів у тромбоцити [299, 300], що притаманне для репаративного остеогенезу в цілому.

Отже, за консолідації переломів довгих трубчастих кісток у собак після остеосинтезу тривалі еритроцитопенія (впродовж 42-х діб) та лейкоцитоз (впродовж 21-ї доби) усуваються за PRF-остеоімплантації чи остеозаміщення гранулами гідроксиапатиту з  $\beta$ -трикальційфосфатом та PRF на 21-шу та 14-ту добу, відповідно, з менш вираженим лейкоцитозом.

**5.2.2. Показники кісткового метаболізму.** У собак за оцінки патохімічної фази репаративного остеогенезу традиційно визначалися концентрації у сироватці крові Ca і P, але нещодавно загально визнаними біохімічними маркерами кісткового метаболізму вважаються [72, 132, 301–

304] кістковий ізофермент лужної фосфатази та тартратрезистентна кисла фосфатаза.

У представленому дослідженні встановлено, що у собак за репаративного остеогенезу зміни вмісту макроелементів у сироватці крові (табл. 5.3) відбувалися в межах фізіологічної норми: для Са – 2,3–3,0 ммоль/л, а для Р – 1,3–1,9 ммоль/л. Після кісткової травми концентрація Р виявилася меншою в 1,1 раза ( $p < 0,01$ ), порівняно з клінічно здоровими тваринами. Далі після остеосинтезу лише на 3-ю добу вона була нижчою, порівняно з показником клінічно здорових тварин, у контрольній ( $p < 0,05$ ) та першій дослідній ( $p < 0,01$ ) групі – на рівні нижньої межі фізіологічної норми. Між групами достовірної різниці не встановлено.

Концентрація Са на 3-ю добу після остеосинтезу була в усіх групах зниженою в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), а далі поступово підвищувалася в бік показника клінічно здорових тварин. При цьому в другій дослідній групі у період з 21-ї та 42-ї доби вона була в 1,1–1,2 раза ( $p < 0,01$ ) вищою як за показник клінічно здорових тварин, так і контрольної групи ( $p < 0,01–0,001$ ).

Тобто динаміка вмісту в сироватці крові Р та Са собак усіх груп виявилася недостатньо інформативною, що також узгоджується з результатами попередніх дослідників [285, 291].

Навпаки, більш інформативною і показовою виявилася динаміка співвідношення Са : Р (індекс Петерсона). У клінічно здорових тварин цей індекс склав 1,74 : 1 (рис. 5.8), а після травми дещо підвищувався – 1,8 : 1. Однак на 3-ю добу після остеосинтезу в тварин контрольної групи встановлено його зменшення до 1,56 : 1 з поступовим підйомом до 14-ї доби – 1,71 : 1. Далі він знову зменшувався на 21-шу добу до 1,57 : 1, а на 42-гу добу підвищувався до 1,71 : 1. Поряд з цим за імплантації PRF-матеріалів (1-а дослідна група) динаміка Са : Р була подібною до показників контрольної групи, проте мала дещо вищі значення. В той же час у тварин 2-ї дослідної групи за імплантації PRF+HA/β-TCP-700 цей індекс вже з 14-ї доби досяг рівня клінічно здорових тварин і тримався у межах 1,83–1,86 : 1 аж до 42-ї доби.

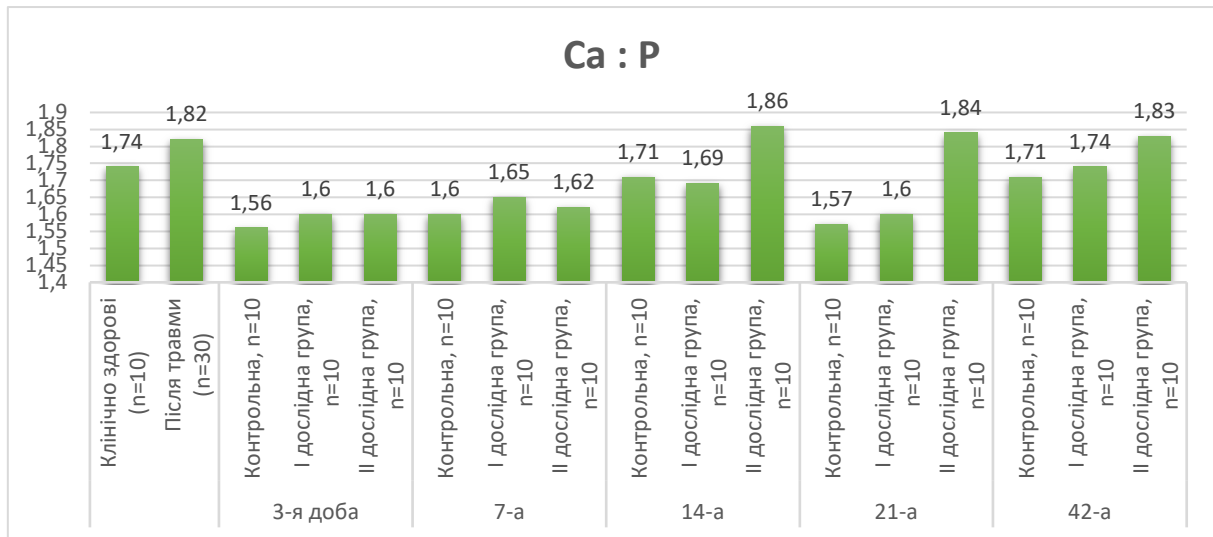


Таблиця 5.3

**Динаміка вмісту макроелементів і маркерів кісткового метаболізму у сироватці крові собак за імплантації  
тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

Терміни дослідження, доба	Групи тварин	Са, ммоль/л	Р, ммоль/л	ЗЛФ, Од/л	КЛФ, Од/л	ТрКФ, Од/л
		Клінічно здорові (n=10)	2,46±0,02	1,41±0,03	40,8±1,36	20,8±1,24
	Після травми (n=30)	2,37±0,05	1,3±0,02 <sup>••</sup>	57,33±1,34 <sup>•••</sup>	23,08±0,73	20,78±0,71 <sup>•</sup>
3-я	Контрольна, n=10	2,05±0,04 <sup>•••</sup>	1,31±0,03 <sup>•</sup>	58,03±0,82 <sup>•••</sup>	29,38±1,32 <sup>•••</sup>	21,41±0,62
	1-а дослідна група, n=10	2,08±0,03 <sup>•••</sup>	1,3±0,02 <sup>••</sup>	57,27±0,47 <sup>•••</sup>	28,33±1,02 <sup>•••</sup>	23,28±1,09
	2-а дослідна група, n=10	2,13±0,07 <sup>•••</sup>	1,33±0,03	56,77±0,92 <sup>•••</sup>	28,25±1,38 <sup>•••</sup>	22,98±0,51
7-а	Контрольна, n=10	2,23±0,04 <sup>•••</sup>	1,39±0,03	54,69±0,93 <sup>•••</sup>	31,5±1,22 <sup>•••</sup>	23,8±0,60
	1-а дослідна група, n=10	2,29±0,04 <sup>••</sup>	1,39±0,03	53,28±0,52 <sup>•••</sup>	33,5±0,89 <sup>•••</sup>	22,8±0,70
	2-а дослідна група, n=10	2,30±0,04 <sup>••</sup>	1,42±0,03	55,5±0,77 <sup>•••</sup>	36,0±1,29 <sup>•••*</sup>	21,9±0,88
14-а	Контрольна, n=10	2,33±0,02 <sup>•••</sup>	1,36±0,02	47,35±1,87 <sup>•</sup>	33,25±0,996 <sup>•••</sup>	22,6±0,62
	1-а дослідна група, n=10	2,38±0,05	1,41±0,04	50,28±1,42 <sup>•••</sup>	37,0±0,91 <sup>•••*</sup>	23,65±0,68
	2-а дослідна група, n=10	2,53±0,04 <sup>•••</sup>	1,36±0,03	50,53±0,76 <sup>•••</sup>	38,5±0,65 <sup>•••••</sup>	27,25±1,09 <sup>••</sup>
21-а	Контрольна, n=10	2,21±0,03 <sup>•••</sup>	1,41±0,03	57,14±0,53 <sup>•••</sup>	38,0±0,86 <sup>•••</sup>	25,51±0,89
	1-а дослідна група, n=10	2,32±0,08	1,45±0,04	54,44±0,69 <sup>•••••</sup>	32,0±0,71 <sup>•••••</sup>	27,98±0,59 <sup>•*</sup>
	2-а дослідна група, n=10	2,60±0,04 <sup>•••••</sup>	1,41±0,03	53,35±0,76 <sup>•••••</sup>	31,8±0,58 <sup>•••••</sup>	30,65±0,92 <sup>•••••</sup>
42-а	Контрольна, n=10	2,43±0,02	1,42±0,03	52,67±1,38 <sup>•••</sup>	30,6±0,51 <sup>•••</sup>	30,58±0,82 <sup>•••</sup>
	1-а дослідна група, n=10	2,49±0,03	1,43±0,03	43,63±0,81 <sup>•••</sup>	25,89±1,14 <sup>••••</sup>	31,64 ±0,67 <sup>•••</sup>
	2-а дослідна група, n=10	2,60±0,04 <sup>••••</sup>	1,42±0,04	42,88±0,94 <sup>•••</sup>	23,25±1,32 <sup>••</sup>	29,9±0,52 <sup>•••</sup>

**Примітка.** Значення р: \* <0,05; \*\* <0,01; \*\*\* <0,001, порівняно з показниками контрольної групи; • <0,05; •• <0,01; ••• <0,001, порівняно з клінічно здоровими тваринами.

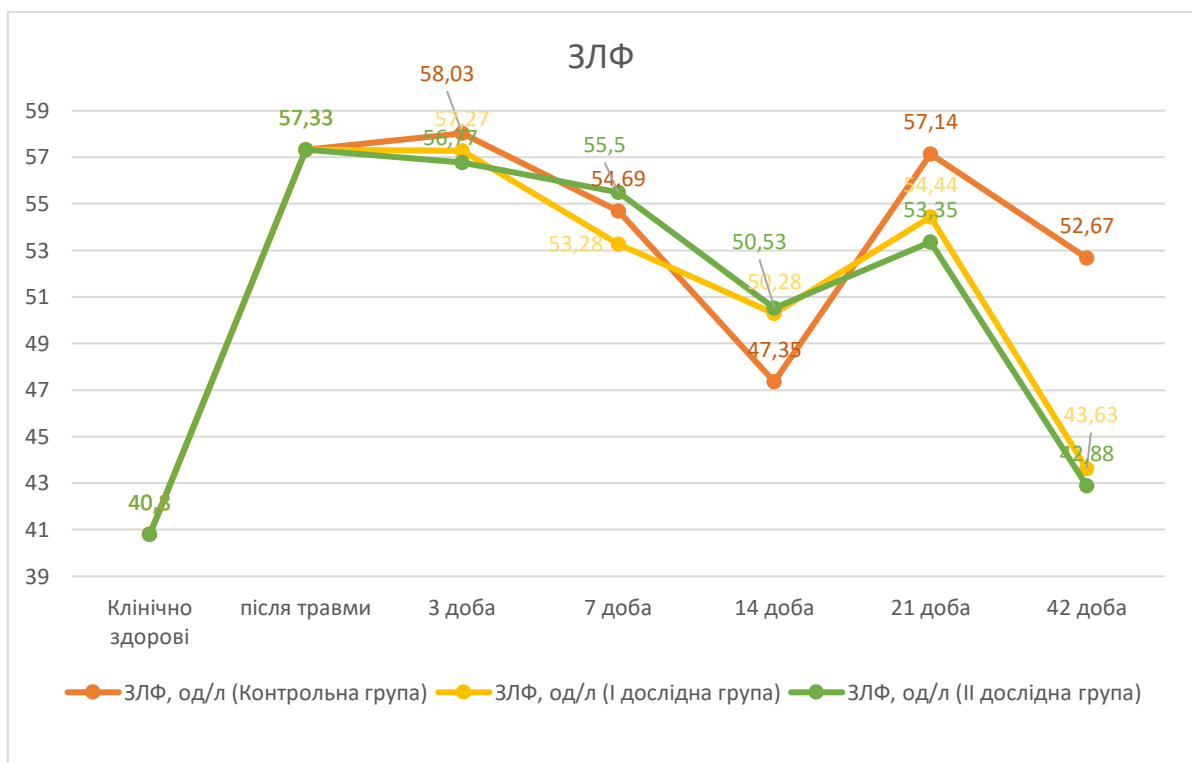


**Рис. 5.8. Динаміка кальцій-фосфорного співвідношення у сироватці крові собак за імплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

Така динаміка макроелементів та Ca : P співвідношення, швидше за все, свідчить про їх інтенсивний перерозподіл у межах кісткової системи у період мінералізації кісткового регенерату, а у 2-й дослідній групі частково є відображенням остеоінтеграції та остеорезорбції кальцій-фосфатної кераміки. Поряд з цим встановлено більш динамічні зміни маркерів кісткового метаболізму за різних умов перебігу стадій репаративного остеогенезу. Спочатку активність ЗЛФ (рис. 5.9) у тварин після травми збільшувалася у 1,4 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з клінічно здоровими тваринами. Після проведення остеосинтезу та імплантації PRF та гідроксиапатитної кераміки її активність у сироватці крові собак усіх груп утримувалася на високому рівні  $53,28 \pm 0,52$  од/л –  $55,5 \pm 0,77$  од/л до 7-ї доби ( $p < 0,001$ ). Надалі вона зменшувалася на 14-ту добу, однак все ж її показники в усіх групах в 1,2 раза ( $p < 0,05 - 0,001$ ) перевищували показник клінічно здорових собак.

На 21-шу добу відмічали другий пік підвищення активності ЗЛФ, який у дослідних групах виявився менш вираженим. Так, якщо в дослідних групах її активність, порівняно з показником клінічно здорових тварин, була більшою в

1,3 раза ( $p<0,001$ ), то в контрольній – в 1,4 раза ( $p<0,001$ ). При чому різниця між ними і контрольною групами виявилася достовірною –  $p<0,01$  та  $p<0,001$ , відповідно. Якщо на 42-гу добу в дослідних групах активність ЗЛФ не мала достовірної різниці з показником клінічно здорових тварин, то у контрольній вона була більшою за нього в 1,3 раза ( $p<0,001$ ), а за показники дослідних груп – в 1,2 раза ( $p<0,001$ ).



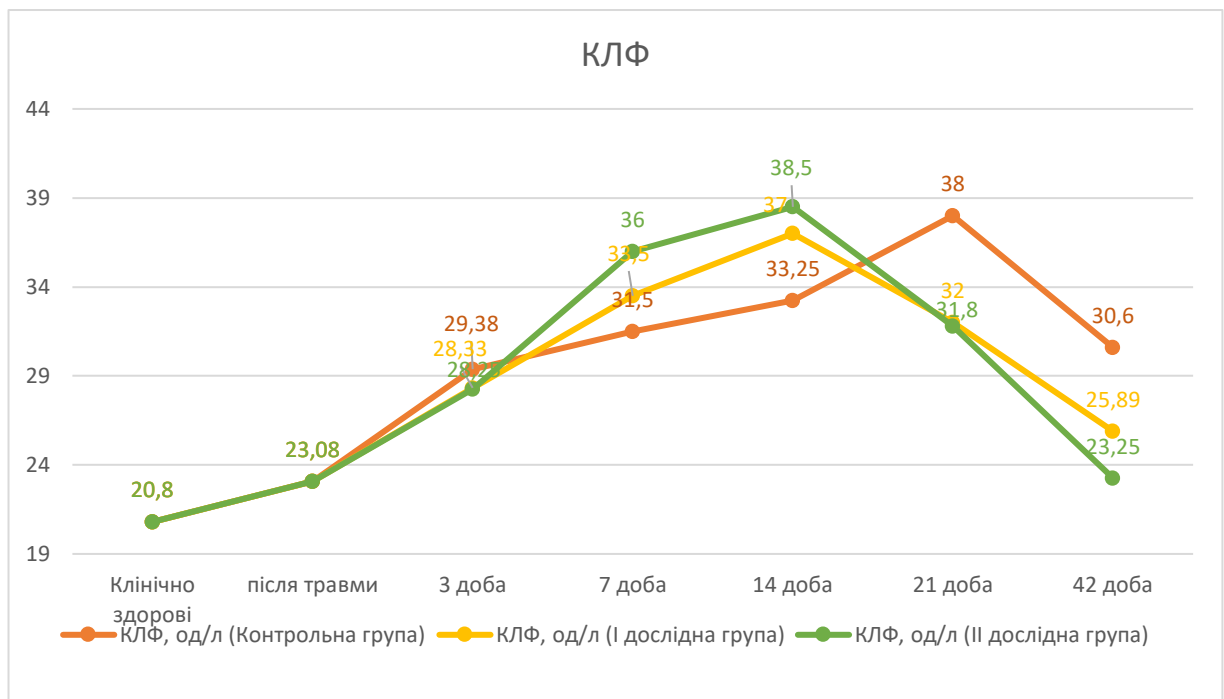
**Рис. 5.9. Динаміка активності ЗЛФ у сироватці крові собак за мплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

Отже, за консолідації переломів довгих трубчастих кісток у собак реєструються два піки підвищення активності ЗЛФ – на 3-ю і 21-шу добу, з достовірно меншим їх рівнем на 21-шу добу та його нормалізацією на 42-гу добу в разі додаткової за остеосинтезу імплантації у ділянку перелому PRP-матеріалів чи проведення остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою в комбінації з PRF.

Активність у сироватці крові кісткового ізоферменту лужної фосфатази (КЛФ) (рис 5.10), яка відображає активність остеобластів, на 3-ю добу після

остеосинтезу також у всіх групах збільшувалася в 1,4 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з показниками клінічно здорових собак за відсутності достовірної різниці між показниками контрольної та дослідних груп.

У наступні терміни, незважаючи на загальну спрямованість динаміки активності цього фермента в усіх групах, виявилися певні часові та якісні відмінності. Так, у контрольній групі пік активності КЛФ встановлено на 21-шу добу репаративного процесу –  $38,0 \pm 0,86$  од./л, збільшення в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з клінічно здоровими тваринами. У 2-й дослідній групі на 7-му добу активність КЛФ виявилася більшою за показник контрольної групи в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ). В обох дослідних групах максимальна активність КЛФ спостерігалась на 14-ту добу, за відсутності достовірної різниці між ними, і перевищувала показник клінічно здорових тварин в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ) в 1-й та в 1,9 раза ( $p < 0,001$ ) в 2-й, а контрольної групи в 1,1 та 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно.

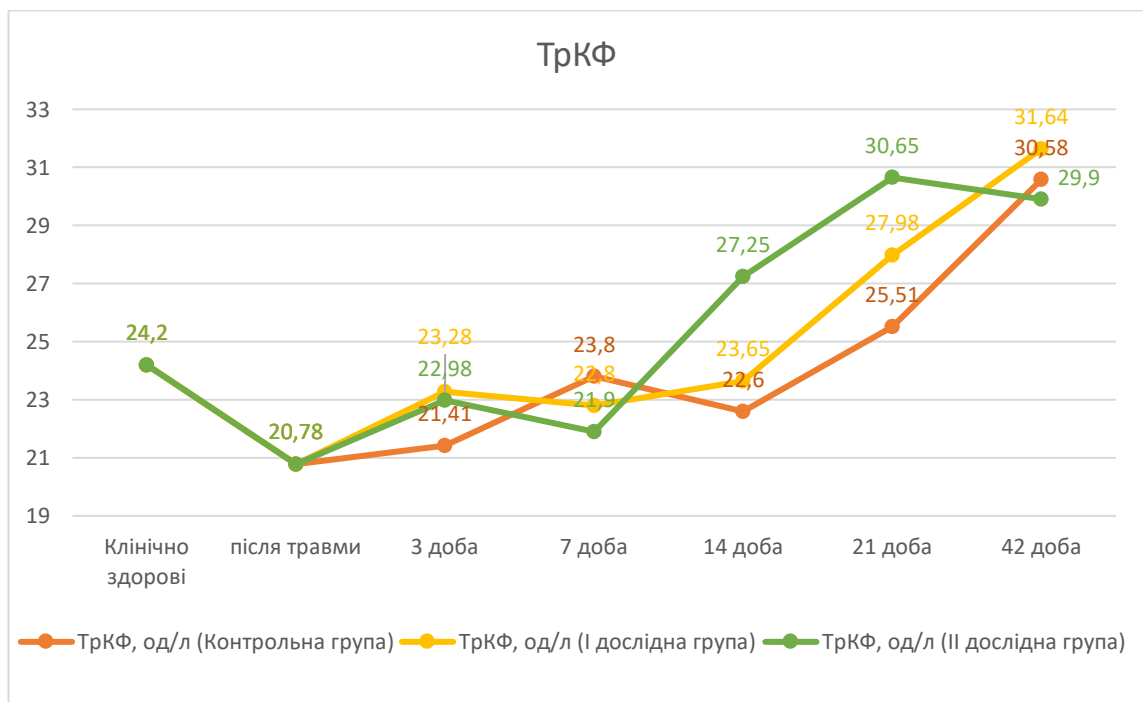


**Рис. 5.10. Динаміка активності КЛФ у сироватці крові собак за імплантації тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

На 42-гу добу в дослідних групах активність КЛФ залишалася ще помірно підвищеною, порівняно з клінічно здоровими тваринами, в 1,2 раза ( $p<0,01$ ) в 1-й та недостовірно в 2-й, тоді як у контрольній у 1,5 раза ( $p<0,001$ ).

Отже, в динаміці активності КЛФ характерним виявилось її перманентне підвищення впродовж всього терміну спостереження за репаративним остеогенезом з піком на 21-шу добу після остеосинтезу, на 14-ту за додаткової імплантації PRF-матеріалів та на 7–14-ту за остеозаміщення композитним PRF-керамічним матеріалом. При цьому, якщо співставити динаміку активності КЛФ з біологічними властивостями останньої, то у випадку контрольної групи у складі лужно-фосфатазної активності в сироватці крові прослідковується наявність тривало діючого запального компонента

Також досить показовою виявилася динаміка активності в сироватці крові тартрат-резистентної кислої фосфатази – маркера остеорезорбції. Спочатку, за кісткової травми, її рівень знижувався в 1,2 раза ( $p<0,05$ ) (рис. 5.11).



**Рис. 5.11. Динаміка активності ТрКФ у сироватці крові собак за імплантації тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

Далі після остеосинтезу та імплантаційного остеозаміщення впродовж перших 14-и діб її активність у контрольній і 1-й дослідній групах не мала достовірної різниці з показником клінічно здорових тварин, тоді як у 2-й дослідній вона виявилася більшою в 1,1 раза ( $p < 0,01$ ) та досягала піку в період 21–42-ї діб – збільшення в 1,3 та 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), відповідно. В контрольній групі активність ТрКФ досягала пікового значення на 42-гу добу – збільшення в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ), а в 1-й дослідній – на 21-шу та 42-гу добу в 1,2 ( $p < 0,05$ ) та в 1,3 ( $p < 0,001$ ) раза, відповідно. При цьому на 21-шу добу в 1-й та 2-й дослідних групах активність ТрКФ була більшою за показник контрольної групи в 1,1 ( $p < 0,05$ ) та в 1,2 ( $p < 0,01$ ) раза, відповідно.

Тобто, в цілому, активність ТрКФ в контрольній і дослідних групах досягала однакових пікових значень, але в різні терміни. В 2-й дослідній групі цей пік починав формуватися вже на 14-ту добу з максимумом на 21-шу, в 1-й – на 21-шу та 42-гу добу, відповідно, а у контрольній з'являвся на 42-гу добу.

З огляду на таку динаміку, з одного боку, це свідчить про більш ранні процеси запальної остеорезорбції в дослідних групах, без яких неможливий остеогенез, та репаративного ремоделювання кісткових регенератів. З іншого, в другій дослідній групі це відображає остеointegraційні процеси кальцій-фосфатної кераміки.

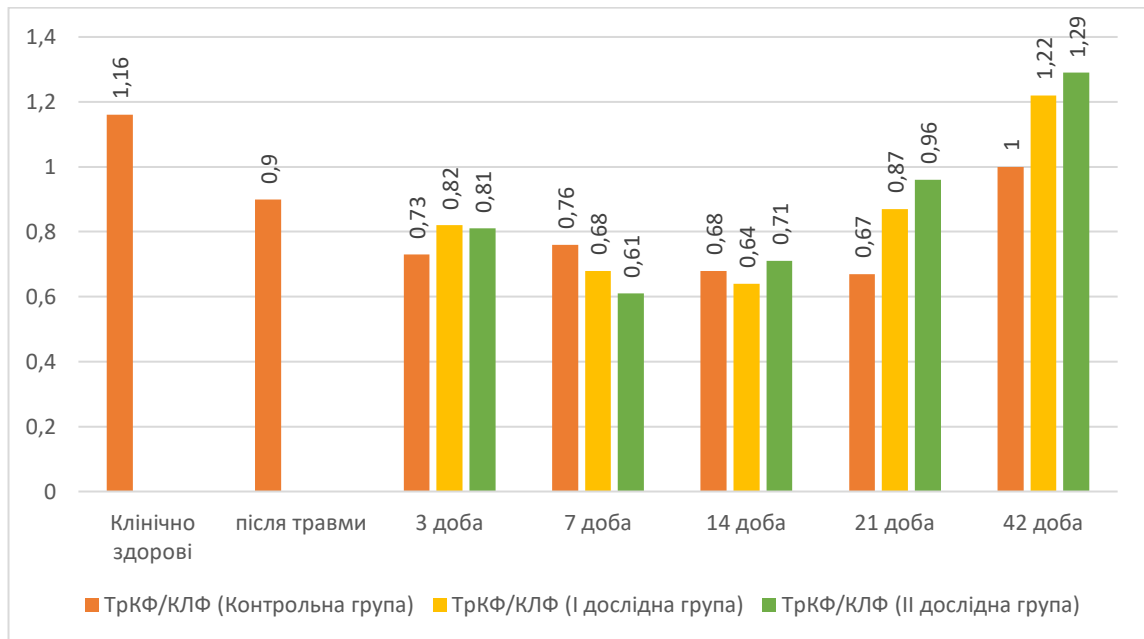
При цьому, фосфатазний коефіцієнт, зниження якого характеризує посилення остеогенних процесів, за репаративного остеогенезу в собак (рис. 5.12) змінювався наступним чином.

З рис. 5.12 випливає, що на 7-му добу в 2-й дослідній групі процеси формування кісткової тканини перебігали більш інтенсивніше, порівняно з іншими досліджуваними групами.

Натомість, пік остеогенезу в 1-й дослідній групі реєстрували на 14-ту добу, тоді як у контрольній групі встановлено його перманентний перебіг.

Вже з 21-ї доби у дослідних групах відмічали урівноваження остеогенних процесів, про що свідчить підвищення ФК, з наростанням явищ остеорезорбції, в той час як у тварин контрольної групи подібну динаміку

встановлено тільки в період 42-ї доби. Так, на 42-гу добу посилення остерезорбції у дослідних групах, що було більш виражене у 2-й дослідній, зумовлене ремоделюванням новоутвореної кісткової тканини.



**Рис. 5.12. Динаміка співвідношення активності ТРкФ до КЛФ у сироватці крові собак за імплантації тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

Отже, відсутність остеозаміщення супроводжується дисбалансом між остеогенними та остерезорбтивними процесами, що додатково сприяє подовженню консолідації, зокрема, за осколкових переломів.

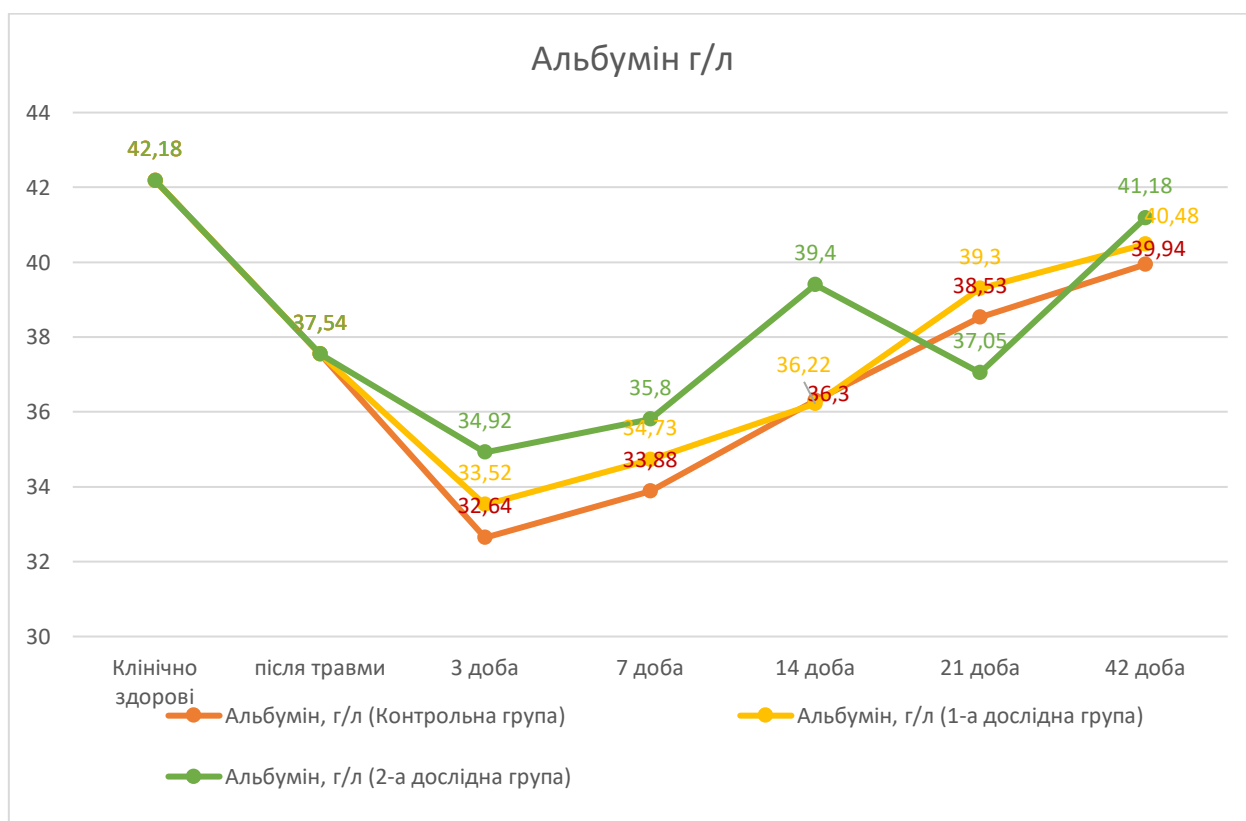
**5.2.3. Динаміка показників гострої фази у собак.** Як було зазначено вище (див. Розд. 2) для оцінки системних змін за консолідації переломів у собак в умовах остеозаміщення та імплантації PRF-матеріалів визначали біохімічні маркери ендотеліальної функції (NO), білки гострої фази (загальний білок, альбумін, гаптоглобін,  $\alpha$ 2-макроглобулін) та маркерів гемокоагуляційних процесів (РФ та АТ-III).

У собак після остеосинтезу, імплантації PRF-матеріалів та їх поєднання з кальцій-фосфатною керамікою динаміка вмісту загального білка у сироватці

крові (табл. 5.4) виявилася без достовірних змін у всіх групах.

Як відомо, альбумін відноситься до негативних реактантів гострої фази, тобто у випадку запально-деструктивних процесів його концентрація у сироватці крові зменшується.

Хоча впродовж усіх термінів дослідження її зміни відбувалися в межах фізіологічної норми – 31–45 г/л [268, 290, 305, 306], проте вони виявилися досить динамічними, особливо в період перших 14-и діб, тобто на стадії запально-резорбтивних процесів. Так, після травми встановлено (рис. 5.13) помірне зниження вмісту в сироватці крові альбуміну в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ), порівняно з клінічно здоровими тваринами. На 3-ю добу репаративного остеогенезу відмічали подальше зниження його рівня в усіх групах. Проте в контрольній і 1-й дослідній групах він зменшувався в 1,3 раза ( $p < 0,01$ ), а в 2-й дослідній – тільки в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 5.13. Динаміка вмісту альбуміну в сироватці крові собак за імплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**



Таблиця 5.4

## Динаміка NO, реактантів гострої фази та за остеозаміщення осколкових переломів у собак

Терміни дослідження, доба	Групи тварин	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Гаптоглобін, г/л	NO, мкмоль/л	Розчинний фібрин, мг%	Антитромбін-III, %	$\alpha$ 2-макроглобулін, г/л
Терміни дослідження, доба	Клінічно здорові (n=10)	70,24±2,21	42,18±2,25	1,5±0,02	26,72±0,93	0,11±0,01	101,3±0,53	2,17±0,07
	Після травми (n=30)	68,41±0,73	37,54±0,44 <sup>•</sup>	1,71±0,02 <sup>•••</sup>	32,56±0,71 <sup>•••</sup>	26,58±0,58 <sup>•••</sup>	79,36±0,71 <sup>•••</sup>	2,07±0,05
3-я	Контрольна, n=10	65,98±1,55	32,64±0,96 <sup>••</sup>	1,9±0,03 <sup>•••</sup>	40,05±1,72 <sup>•••</sup>	32,64±1,56 <sup>•••</sup>	67,94±1,03 <sup>•••</sup>	2,28±0,04
	1-а дослідна група, n=10	68,13±1,28	33,52±1,96 <sup>••</sup>	1,91±0,03 <sup>•••</sup>	28,88±1,05 <sup>***</sup>	29,67±0,91 <sup>•••</sup>	71,45±1,44 <sup>•••</sup>	2,2±0,02
	2-а дослідна група, n=10	66,7±1,05	34,92±1,73 <sup>•</sup>	1,89±0,02 <sup>•••</sup>	29,58±2,14 <sup>**</sup>	27,08±0,97 <sup>**•••</sup>	73,1±1,41 <sup>**•••</sup>	2,2±0,04
7-я	Контрольна, n=10	70,04±1,11	33,88±1,07 <sup>••</sup>	1,87±0,02 <sup>•••</sup>	35,05±0,99 <sup>•••</sup>	28,45±1,17 <sup>•••</sup>	77,93±1,32 <sup>•••</sup>	2,17±0,03
	1-а дослідна група, n=10	69,57±0,83	34,73±0,80 <sup>••</sup>	1,85±0,03 <sup>•••</sup>	39,86±1,64 <sup>*•••</sup>	25,97±0,49 <sup>•••</sup>	82,9±1,32 <sup>*•••</sup>	2,18±0,03
	2-а дослідна група, n=10	69,93±0,45	35,8±1,71 <sup>•</sup>	1,87±0,03 <sup>•••</sup>	51,4±1,48 <sup>***•••</sup>	22,45±1,0 <sup>**•••</sup>	84,37±1,36 <sup>**•••</sup>	2,16±0,05

Продовження таблиці 5.3

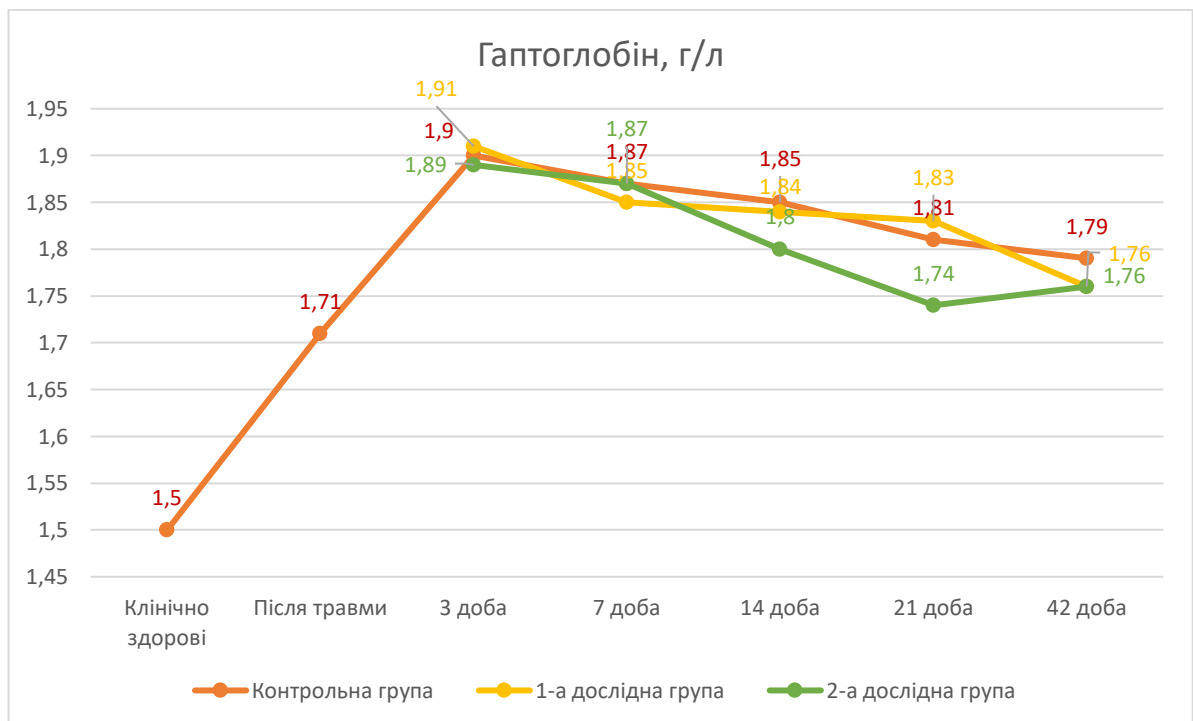
14-а	Контрольна, n=10	70,73±0,97	36,3±1,63 <sup>•</sup>	1,85±0,03 <sup>•••</sup>	28,73±1,43	36,43±0,99 <sup>•••</sup>	83,07±0,81 <sup>•••</sup>	2,14±0,03
	1-а дослідна група, n=10	70,64±0,59	36,22±1,85	1,84±0,03 <sup>•••</sup>	44,98±2,02 <sup>•••••</sup>	28,94±0,49 <sup>•••••</sup>	90,14±2,43 <sup>•••</sup>	2,19±0,05
	2-а дослідна група, n=10	69,9±1,33	39,4±1,00	1,8±0,03 <sup>•••</sup>	44,85±3,91 <sup>•••</sup>	26,43±0,33 <sup>•••••</sup>	93,92±1,08 <sup>•••••</sup>	2,17±0,05
21-а	Контрольна, n=10	69,78±0,86	38,53±1,18	1,81±0,03 <sup>•••</sup>	28,68±2,1	25,26±0,87 <sup>•••</sup>	90,65±1,56 <sup>•••</sup>	2,15±0,02
	1-а дослідна група, n=10	70,5±1,82	39,3±1,07	1,83±0,03 <sup>•••</sup>	45,8±2,28 <sup>•••••</sup>	24,2±0,79 <sup>•••</sup>	95,48±0,84 <sup>•••</sup>	2,18±0,03
	2-а дослідна група, n=10	70,92±0,84	37,05±1,45	1,74±0,04 <sup>•••</sup>	50,3±2,991 <sup>•••••</sup>	21,53±0,94 <sup>•••••</sup>	95,93±0,49 <sup>•••••</sup>	2,16±0,02
42-а	Контрольна, n=10	71,26±1,68	39,94±1,13	1,79±0,03 <sup>•••</sup>	27,24±1,27	15,31±1,0 <sup>•••</sup>	96,81±0,58 <sup>•••</sup>	2,17±0,05
	1-а дослідна група, n=10	70,78±1,56	40,48±1,12	1,76±0,04 <sup>•••</sup>	42,16±1,54 <sup>•••••</sup>	13,33±0,72 <sup>•••</sup>	102,53±0,9 <sup>•••</sup>	2,16±0,02
	2-а дослідна група, n=10	73,03±0,93	41,18±2,08	1,76±0,06 <sup>•••</sup>	47,23±2,23 <sup>•••••</sup>	13,43±0,75 <sup>•••</sup>	103,53±1,05 <sup>•••</sup>	2,17±0,02

**Примітка.** Значення p: \* – < 0,05; \*\* – < 0,01; \*\*\* – < 0,001, порівняно з показником контрольної групи; • – < 0,05; •• – < 0,01; ••• – < 0,001, порівняно до показників клінічно здорових тварин.

Поряд з цим уже на 7-му добу в контрольній і дослідних групах намітилася тенденція до відновлення рівня альбуміну, який у контрольній групі на 14-ту добу ще залишався зменшеним у 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Тобто, за динамікою концентрації альбуміну в дослідних групах реакція гострої фази більш швидкоплинна (впродовж перших 7-и діб) і дещо менш інтенсивна у разі остеозаміщення (2-а дослідна група).

Однак між групами тварин достовірна різниця у цей термін, так і у наступні, за вмістом у сироватці крові альбуміну не встановлено.

Натомість концентрація гаптоглобіну (рис. 5.14) як позитивного білка гострої фази, навпаки, після кісткової травми у собак збільшувалася в 1,1 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових тварин, та сягала свого



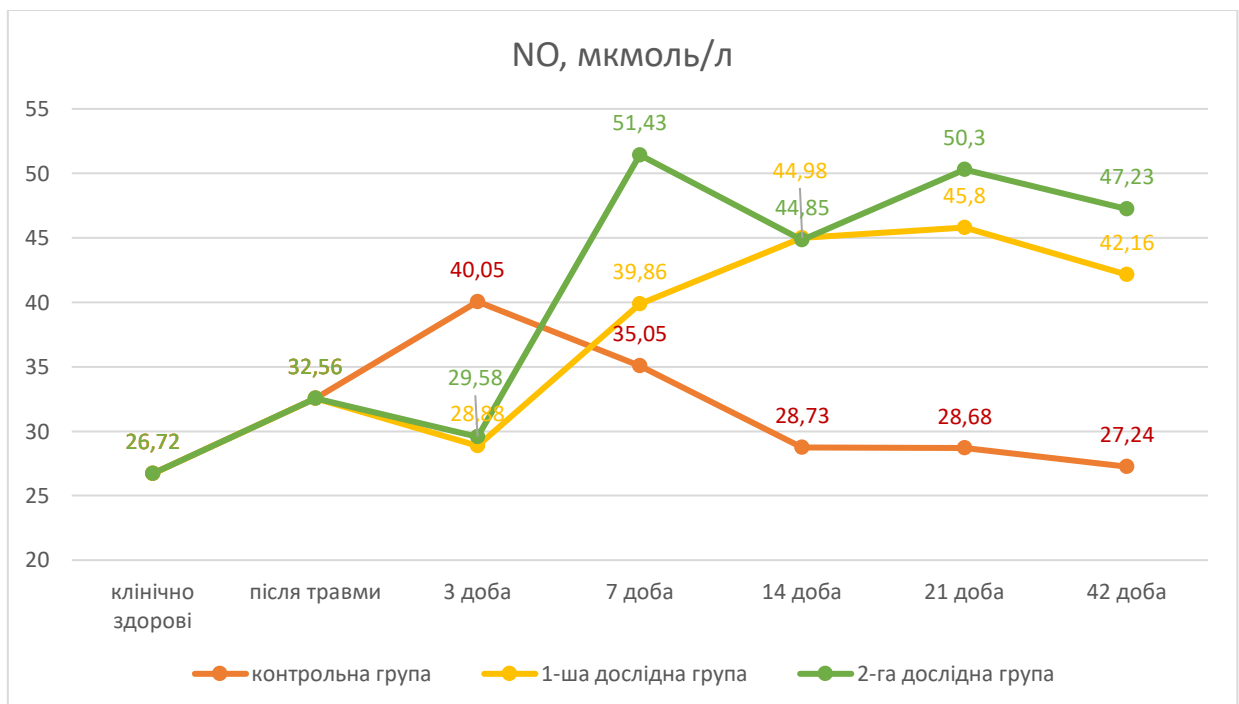
**Рис. 5.14. Динаміка вмісту гаптоглобіну в сироватці крові собак за імплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

піку в усіх групах на 3-ю добу ( $p < 0,001$ ). В усіх групах вона підвищувалася в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ). Далі відмічали поступове її зниження у сироватці крові,

проте навіть на 42-гу добу рівень цього білка гострої фази все ще був достовірно підвищеним в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), порівняно з показником клінічно здорових тварин. Водночас достовірних відмінностей між групами не встановлено.

Отже, у ранній посттравматичний період рівень загального білка та альбуміну залишається в межах фізіологічної норми, проте з певною тенденцією до формування гіпоальбумінемії. Проте у разі PRF-імплантації чи композитного остеозаміщення це явище швидкоплинне та менш інтенсивне. Водночас перманентне підвищення гаптоглобіну не тільки відображає інтенсивність запально-резорбтивної стадії, а свідчить про його участь у репаративному остеогенезі як носія гемоглобіну [290, 294, 295].

Динамічною та фазовою виявилася динаміка вмісту в сироватці крові NO. Спочатку було встановлено, що на 3-ю добу після травми, його рівень (рис. 5.15) підвищувався в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ).



**Рис. 5.15. Динаміка вмісту NO в сироватці крові собак за імплантації тромбоцитарних концентратів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

Однак у наступні терміни дослідження динамічні зміни цього показника в контрольній і дослідних групах суттєво різнилися. Зокрема у контрольній групі максимальну концентрацію NO у сироватці крові реєстрували на 3-ю добу, яка у 1,5 ( $p < 0,001$ ) раза була вищою за показник клінічно здорових тварин. Підвищеною в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ) вона залишалася і на 7-му добу, а далі, коливалася в межах 27,24–28,73 мкмоль/л.

Водночас, за імплантації в кісткові дефекти і-PRF чи PRF та остеозаміщення на 3-ю добу репаративного остеогенезу рівень NO знижувався і не мав достовірної різниці з показником клінічно здорових собак.

Далі, на 7-му добу він різко збільшувався, порівняно з клінічно здоровими тваринами в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) в 1-й дослідній групі та в 1,9 раза ( $p < 0,001$ ) в 2-й дослідній групі за різниці між цими групами в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ). Високим рівень NO в дослідних групах залишався і в наступні терміни дослідження. В 1-й дослідній групі він продовжував збільшуватися і досягав пікового значення на 21-шу добу –  $45,8 \pm 2,28$  мкмоль/л, тоді як у 2-й дослідній було зареєстровано ще один його пік –  $50,3 \pm 2,99$  мкмоль/л. На кінець, на 42-гу добу концентрація NO в цих групах ще залишалася високою –  $42,16 \pm 1,54$  та  $47,23 \pm 2,23$  мкмоль/л, відповідно.

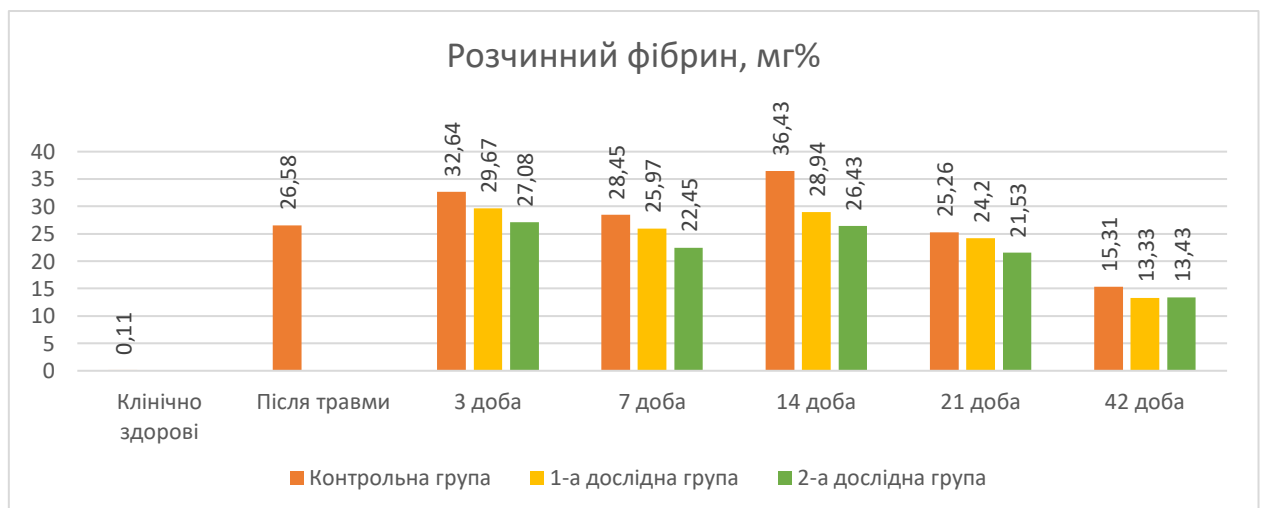
Таким чином, підвищений рівень у сироватці крові NO в контрольній групі утримувався впродовж перших 7-ми діб репаративного остеогенезу після проведення остеосинтезу довгих трубчастих кісток. Для 1-ї дослідної групи у його динаміці виявився характерним наростаючий пік концентрації NO до 14-ї доби з наступним її утриманням на досить високому рівні. Натомість для 2-ї дослідної групи характерними були два піки рівня NO – на 7-му та 21-шу добу, та його достатньо високі показники у проміжку між ними. Оскільки [124, 265, 307] NO продукується лейкоцитами за індукції індукцибельної NO-синтази або ж ендотеліальними клітинами під впливом ендотеліальної NO-синтази, то у випадку контрольної групи переважав прозапальний тип підвищення рівня NO, який у дослідних групах був короткотривалим, а далі змінювався на ендотеліальний. Це, опосередковано, засвідчує про інтенсивний

неоангіогенез у разі імплантації в ділянку кісткової травми PRF-матеріалів, особливо за їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою для остеозаміщення.

В нормі в плазмі крові ссавців РФ виявляється в надзвичайно невеликих кількостях. Значне збільшення його концентрації вважається [265] прямою ознакою тромбінемії внаслідок гіперкоагуляційних процесів. Останні закономірно набувають розвитку за кісткової травми [308–310], про що свідчить високий рівень у собак за переломів кісток –  $26,58 \pm 0,58$  мг%. З певними коливаннями, але в усіх групах пікових значень він набував на 14-ту добу репаративного остеогенезу, а далі поступово знижувався.

Однак у дослідних групах вміст у плазмі крові РФ (рис. 5.16) виявився нижчим, порівняно з показником контрольної групи.

Так, у 1-й дослідній групі на 14-ту добу його рівень був у 1,3 раза нижчим ( $p < 0,001$ ), порівняно з контрольною групою, тоді як у 2-й дослідній у 1,2 раза ( $p < 0,01$ ) меншим на 3-ю добу, в 1,3 раза ( $p < 0,01$ ) на 21-шу добу репаративного остеогенезу. Тобто остеозаміщення супроводжується суттєвим зменшенням рівня тромбінемії та, відповідно, інтенсивності гіперкоагуляційного синдрому, що сприяє прискоренню консолідації переломів. Це до певної міри корелює з динамікою активності АТ-III.



**Рис. 5.16. Динаміка вмісту РФ в плазмі крові собак за імплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою**

На антитромбін-III припадає близько 75% антитромбіннової активності плазми крові [266, 267] з вираженими протизапальними властивостями. Він синтезується ендотеліальними клітинами та у печінці. Активність АТ-III менше за 85% вважається [266, 267, 311, 312] потенційною формою тромбофілії. У його функції входить інактивація тромбіну, інгібування деяких факторів системи згортання крові та активних компонентів калікреїн-кініново системи і комплементу.

Встановлено (рис. 5.17), що після кісткової травми розвивався дефіцит активності АТ-III, яка знижувалася в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ).

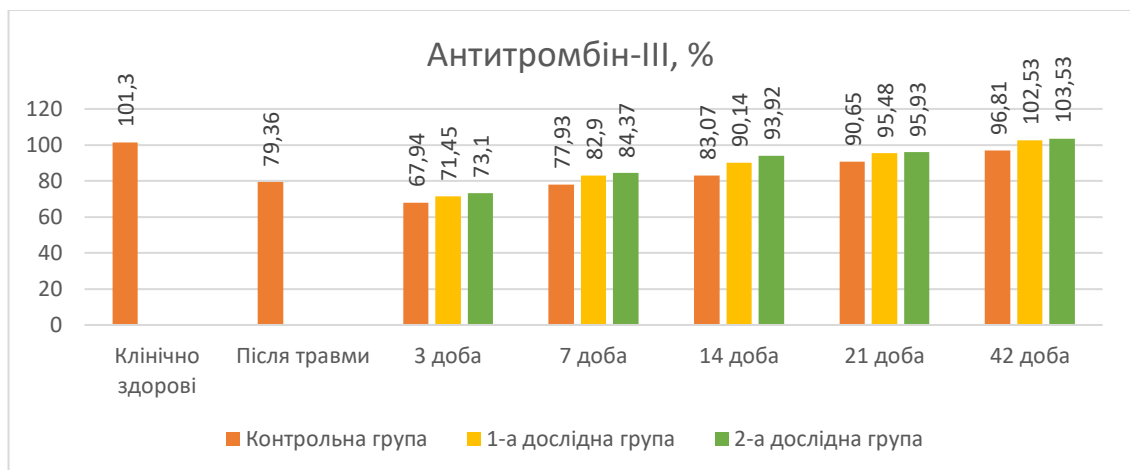


Рис. 5.17. Динаміка активності АТ-III в плазмі крові собак за імплантації PRF-матеріалів та їх комбінації з кальцій-фосфатною керамікою

Далі вона поглиблювалася на 3-ю добу в усіх групах. Зокрема у контрольній групі активність АТ-III була нижчою, порівняно з показником клінічно здорових тварин в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) та мала найнижче значення серед груп –  $67,94 \pm 1,03$  %. З 7-ї доби репаративного остеогенезу намітилася загальна тенденція до зменшення ризику тромбофілійного стану тварин. При цьому в дослідних групах рівень активності АТ-III виявився в 1,1 раза ( $p < 0,05-0,01$ ) вищим, ніж у контрольній, а на 14-ту добу він зникав. Однак у контрольній групі активність АТ-III ще залишалася критичною –  $83,07 \pm 0,81$ %, і лише на 21-шу добу досягала рівня  $90,65 \pm 1,56$ %. Поряд з цим, як на 21-шу, так і на

42-гу добу антитромбінова активність плазми крові собак дослідних груп виявилася достовірно вищою, ніж у контрольній.

Таким чином, репаративний остеогенез за переломів довгих трубчастих кісток у собак, особливо із кістковими дефектами, супроводжується розвитком гіперкоагуляційного синдрому з дефіцитом антитромбінової активності, що може бути ризиком ускладненої консолідації переломів кісток унаслідок системних порушень локальної мікроциркуляції та, відповідно, ішемії/гіпоксії кісткового регенерата. За osteoімплантації PRF-матеріалів та особливо їх композиції з гідроксиапатитною керамікою антитромбіновий потенціал плазми крові відновлюється вже на 14-ту, тоді як у контрольних тварин тільки на 21-шу добу репаративного остеогенезу.

Частково, в критичних ситуаціях, антитромбіновим потенціалом володіє і  $\alpha_2$ -М – регулятор активності більшості протеїназ і молекул, що безпосередньо бере участь в презентації антигенів [313–315].

Проте у всіх групах достовірних змін концентрації  $\alpha_2$ -М (табл. 5.3) протягом усього періоду дослідження не встановлено.



## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

В останнє десятиліття відбулося суттєве удосконалення травматологічної і ортопедичної допомоги, особливо у дрібних домашніх тварин, зокрема щодо діагностичної візуалізації та запровадження у широку клінічну практику сучасних методів і засобів остеосинтезу за переломів кісток. Однак [1, 11, 13, 15, 17], кістково-суглобова патологія у тварин-компаньонів (собак і котів) досить поширена, представлена різноманітними нозологічними формами та супроводжується низкою ускладнень.

Хвороби опорно-рухового апарату в собак зустрічаються доволі часто та мають найбільшу частоту виникнення, порівняно з іншими видами тварин, що складає близько 17 %. За аналізу захворюваності на цю патологію та її класифікації у вітчизняній ортопедичній науці та практиці здебільшого враховується анатомо-топографічна локалізація травми [7, 9, 11–15, 16], тоді як у світовій практиці [9, 19–24] враховується низка різноманітних факторів, а класифікація переломів здійснюється відповідно до принципів AO/ASIF [20, 316, 317]. Лише в по-одиноких вітчизняних дослідженнях [18] ураховуються такі принципи, із яких випливає, що найскладнішими є осколкові переломи кісток, їх інфіковані ускладнення та переломи, які супроводжуються втратою великого об'єму кістки або зв'язку із м'якими тканинами. Вони виникають унаслідок дії значної механічної сили (високоенергетичні переломи), а супутня травма великого об'єму м'яких тканин, у свою чергу, зумовлює значно більший ступінь пошкоджень із втратою кровозабезпечення ділянки кісткової травми. Окрім цього низка факторів можуть підвищувати ризик виникнення переломів: фізіологічний стан тварини, її вік, супутні захворювання, що зумовлюють зниження міцності кістки та імунітету, або ж порушувати крово- і лімфообіг і перебіг молекулярно-біологічних процесів репаративного остеогенезу [20, 22, 24, 28–30].

Хоча для лікування переломів кісток, розроблена низка методів остеосинтезу – інтрамедулярний, інтрамедулярний блокуючий, накістковий (екстракортикальний) та дистракційний остеосинтез і апарати зовнішньої фіксації, проте в будь-якому разі той чи інший метод остеосинтезу може мати свої як переваги, так і недоліки. До останніх відносяться міграція штифтів, недостатнє усунення ротаційних рухів кісткових уламків та забезпечення поздовжньої підтримки, необхідність повторного оперативного втручання значного об'єму з метою демонтажу пластин, обробки протягом тривалого періоду місць виходу шпичь при застосуванні зовнішньої фіксації, ризику інфікування місць імплантації шпичь [12, 11, 15, 20, 33]. Великий діастаз між уламками та відсутність біологічної матриці, з одного боку, гальмують міграцію, а з другого, диференціацію і проліферацію прогеніторних остеогенних клітин, які забезпечують фактори росту і кістково-морфогенетичні білки гематоми [104]. Все це в цілому призводить до низки різноманітних ускладнень, таких як незрощення, деформації, укорочення кінцівки, періостит, остеомієліт, несправжній суглоб і навіть остеосаркоми.

За осколкових переломів одним із оптимальних методів лікування є накістковий остеосинтез (екстракортикальний), за рахунок якого відбувається максимальне забезпечення стабільності ділянки перелому, однак і він не повною мірою забезпечує їх консолідацію. Тому часто для оптимізації репаративного остеогенезу використовуються імуномодулятори, вітамінно-мінеральні добавки, проводиться його фармакологічна корекція [42–44].

З огляду на вище зазначене, переломи зі значними дефектами кісткової тканини залишаються суттєвою проблемою у ветеринарній ортопедії, потребують комплексного забезпечення остеокондуктивних та остеоіндуктивних механізмів репаративного остеогенезу [34–36], розроблення відповідних остеозаміщувальних матеріалів.

До причин виникнення дефектів кісткової тканини, окрім травм, відносяться неоплазії, порушення кісткового метаболізму, вроджені порушення або аномальний розвиток скелета [58].

Для вирішення проблеми консолідації осколкових фрактур в останні десятиліття сформувався новий напрямок у гуманій та ветеринарній медицині – регенеративна медицина [118, 134]. Це нова галузь, яка швидко розвивається та спрямована на повну заміну або регенерацію клітин, тканин або органів для відновлення нормальної їх функції. Вона включає тканинну інженерію, а також клітинну та позаклітинну стимуляцію ендогенних механізмів самовідновлення [135, 136].

Значна кількість робіт у галузі регенеративної медицини, присвячені використанню PRP-матеріалів, які найбільш близькі до практичного застосування [120, 142, 143].

В останні роки численні їх ефекти були задокументовані *in vivo* та *in vitro* у медицині та ветеринарії. Відомі роботи щодо застосування PRP-матеріалів в ортопедії [225, 318–321], зокрема за тендинопатій [150, 233–325], остеоартритів [251], для відновлення дефектів хрящової тканини [244, 245] пародонту [86, 205] та переломів як самостійні, індукуючі регенерацію компоненти, [85] так і у поєднанні їх з іншими матеріалами [62]. Також існують дослідження щодо використання PRP-матеріалів для лікування ран [226–228], гематом [323], виразок шкіри з втратою великого об'єму тканин [324–326], хронічних виразок [327], ран після хірургічного втручання [328, 329], в офтальмології [232], для регенерації периферичних нервів [330] та з метою антимікробної дії на інфіковані рани шкіри [213]. Результати цих досліджень доволі різноманітні та суперечливі, що може бути зумовлене відсутністю стандартизації методів отримання PRP [57, 207, 208]. Основа проблеми полягає у великому різноманітті методик приготування PRP-матеріалів та недостатній оцінці їх кінцевого продукту за величиною концентрації тромбоцитів, ділянками найбільшої клітинної концентрації та реалізації біологічного потенціалу.

Хоч використання PRP-матеріалів має багато переваг, як безпечність завдяки її аутологічному походженню [142, 179, 203, 20], простота збору зразків крові для їх виготовлення та доступність у будь-яких умовах. Проте

поряд з цим необхідна об'єктивна оцінка використаних антикоагулянтів, власне складу PRP і його біологічних властивостей, що залежить від методики одержання, способів активації тромбоцитів, що, ймовірно, позначається на клінічній ефективності [26, 331]. В цілому це, нерідко, зумовлює суперечливу інтерпретацію результатів застосування PRP [119].

Відомі поодинокі роботи [332] щодо використанням PRP-матеріалів ксенологічного походження з аргументацією позитивних результатів у загоєнні м'яких тканин унаслідок імунологічної реакції на плазму іншого виду тварин.

Отже різноманітність форм тромбоцитарних масі неоднозначність в оцінці їх застосування зумовили проведення комплексного клініко-рентгенологічного, макро- і гістоморфологічного, гематологічного і біохімічного дослідження впливу збагачених тромбоцитами аутоплазми, ауто-ін'єкційного та щільного фібрину і ксенологічного фібрину на репаративний остеогенез за модельних переломів у кролів.

Попередньо було встановлено склад PRP-матеріалів та оптимальні режими їх одержання з метою дослідження у них найбільшої концентрації тромбоцитів як у рідкій, так і щільній формах. У випадку щільної форми PRF виникла необхідність виявлення розподілу та місць концентрації тромбоцитів у згустках, оскільки саме ці клітини містять низку факторів росту [39, 48, 65, 67, 69], які індукують регенеративний потенціал.

Хоча концентрація тромбоцитів у PRF-матеріалах є ключовим критерієм їх ефективності, однак тривалість продукції ними факторів росту може бути суттєвою у разі динамічної зміни фаз запально-резорбтивного процесу. Так, наприклад, відомо [333], що їх друге покоління – PRF-матеріали, характеризуються повільнішим та більш тривалим у часі (до 10-ти діб) випуском з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів наступних факторів – PDGF [143, 165], TGF- $\beta$ , FGF, IGF-1, IGF-2, VEGF, EGF, IL-8, KGF, CTGF [39, 48, 65, 67, 69]. Це також спонукало провести доклінічні дослідження різних форм PRF для

встановлення гістоморфологічних, гематологічних і патогенетичних критеріїв можливої їх ефективності за репаративного остеогенезу.

На початку розвитку другого покоління тромбоцитарних концентратів не надавалося особливого значення умовам центрифугування зразків крові, хоч це могло бути ключовим чинником у співвідношенні клітинних елементів у згустках фібрину.

Центрифугування – це процес, який унаслідок взаємодії різних сил тяжіння частинок (клітин), гравітаційної та відцентрової сил приводить до розподілу клітин у певному об'ємі та залежності від їх маси і розміру [164]. За даними авторів [88, 89, 160] тип центрифуги, швидкість її обертання і діаметри роторів відіграють суттєву роль, оскільки за їх різних параметрів отримують і різні за складом та властивостями тромбоцитарні матеріали, що може суттєво вплинути на ефективність застосування PRP-матеріалів та є доволі дискусійним [182]. Результатами цього дослідження зокрема встановлено, що зміна діапазону відцентрової сили центрифугування зразків крові має ключове значення під час одержання PRP-матеріалів.

Відомо [82, 214], що кількість тромбоцитів у PRP здатна впливати на репаративні процеси наступним чином: стимулюючи їх за концентрації  $800\text{--}1500 \times 10^9/\text{л}$  та, навпаки, інгібуючи, коли цей показник перевищує  $5000 \times 10^9/\text{л}$ . При цьому низка антикоагулянтів [88, 119] – цитрат натрію, гепарин, натрій EDTA та калій EDTA (Натрій- та Калій-етиленадіамінтетраоцтова кислота), за даними [334] не рекомендуються для приготування тромбоцитарних концентратів, оскільки вони зумовлюють втрату зернистості тромбоцитів та змінюють рН у межах (7,2–8,0).

Проведене дослідження демонструє, що PRP одержана при 100 g, хоч і мала дещо менший об'єм, все ж містила необхідну кількість клітин, яка необхідна для індукції репаративного потенціалу тканин –  $824 \pm 30,4$  Г/л, що досягається центрифугуванням протягом 3 хв. За відцентрової сили центрифугування 400 g протягом 10 хв вона становила –  $550 \pm 21,2$  Г/л. Однак,

за подальшого збільшення відцентрової сили кількість клітин у зразках плазми крові динамічно зменшується.

Існує припущення [274], що величина відцентрової сили також може суттєво впливати на вихід біоактивних речовин із  $\alpha$ -гранул тромбоцитів.

На відміну від PRP, PRF складається із сітки фібринових ниток, серед яких, у залежності від величини відцентрової сили центрифугування, у різних ділянках згустків розташовуються еритроцити, лейкоцити і тромбоцити у вигляді скупчень [75–78]. Зважаючи на те, що I-PRF знаходиться у рідкій формі, він все ж через деякий час полімеризується і перетворюється у щільний згусток, схожий за зовнішнім виглядом на PRF, хоч і менший за об'ємом. Відмітимо, що у результаті аналізу їх гістоструктури в представленому дослідженні, саме у формі PRF-зразків було виявлено найвищі концентрації лейкоцитів і тромбоцитів, які майже рівномірно були розподілені в різних шарах біоматеріалу.

За даними [259] щодо визначення кількості клітин у згустках PRF залежно від різних режимів центрифугування та концентрації судинно-ендотеліального фактора росту, зниження відносної відцентрової сили зумовлює підвищення вмісту лейкоцитів і, відповідно, концентрації судинно-ендотеліального фактора росту (VEGF) [164, 259]. Проте ці результати, на відміну від представленої дослідження, не вказують на ділянки розподілу клітин у згустках.

Представлені результати дають розуміння того факту, що різні режими центрифугування також впливають і на властивості PRF-матеріалів, зокрема на довжину одержаних фібринових згустків та їх гістоструктуру. При чому підвищення відцентрової сили призводить до збільшення об'єму утвореного PRF, проте обернено пропорційно викликає зменшення в ньому кількості тромбоцитів та їх нерівномірний розподіл. Тобто застосування невеликої кількості I-PRF або недостатньо насичених тромбоцитами ділянок згустків PRF може впливати на репаративні процеси. Різні частини фібринових згустків будуть значно відрізнятися за складом і концентрацією лейкоцитів і

тромбоцитів, та відповідно як наслідок, різною концентрацією та ступенем екскреції факторів росту.

Поряд з цим необхідно врахувати, що лейкоцити, які також потрапляють у I-PRF, теж є джерелом VEGF та інших факторів росту [88], а нейтрофіли зумовлюють випуск протеаз та інших речовин, спрямованих на боротьбу з шкідливими мікроорганізмами. Не виключено, що імплантація великої їх кількості у тканини з частиною згустку PRF може викликати додаткові тканинні реакції, в першу чергу запальногочі імуноопосередкованого характеру. В зв'язку з цим врахування клітинного складу у окремих ділянок фібринових матриць, виготовлених за різних значень відцентрової сили [259, 274], створює можливості формування протоколів приготування PRF для оптимізації репаративних процесів у різних типах тканин і на різних стадіях їх перебігу.

Виходячи з цього, доклінічними дослідженнями було проведено моніторинг різних форм тромбоцитарних концентратів за модельних дефектів кісткової тканини у кролів з імплантуванням у них PRP-матеріалів першого і другого покоління, виготовлених за оптимальних режимів центрифугування для встановлення ступеня їх впливу на репаративний остеогенез.

Водночас наявність лише факторів росту в ділянці кісткової травми не може замінити відсутність остеокондуктивної матриці у кістковому дефекті, що зумовлює необхідність остеозаміщення втраченого об'єму кісткової тканини. Дотепер вона набуває широкого обґрунтування як у ветеринарній, так і у гуманній ортопедії [53, 133], і спрямоване на комплексне забезпечення відновлення механізмів остеорепаративних процесів.

Остеозаміщувальні матеріали мають володіти низкою властивостей: остеокондуктивними, остеоінтеграційними, остеоіндуктивними і остеогенними [335, 336]. Нині для остеозаміщення розробляються і обґрунтовуються цілі групи матеріалів, які мають різне походження, структуру, фізико-хімічні і біологічні властивості: метали; синтетичні

полімери; керамічні, у тому числі кальцій-фосфатні; біоскло; біосітали; склокераміка; вуглецеві; колагенові [53, 110].

Проте серед них найбільш перспективними для широкої клінічної практики вважаються кальцій-фосфатні матеріали (гідроксиапатитні композити), оскільки вони за складом найбільш подібні до мінерального компоненту кісткової тканини і володіють вираженими остеокондуктивними та остеоінтеграційними властивостями, що однак залежить від їх фазового складу, величини пор і адсорбційної активності. Включення до складу кальцій-фосфатної кераміки іонів кремнію [110] чи германію [53] до 1–1,5% зумовлюють її остеіндуктивність. У зв'язку з цим під час проведення дослідження була сформована ще одна група тварин для оцінки можливості реалізації остеокондуктивних і остеогенних властивостей PRP-речовин у композиті з гідроксиапатитною керамікою.

При цьому попередньо врахували, що загоєння переломів під кров'яним згустком – це природний процес, а гематома, яка утворюється під час травми має ключове значення у первинній індукції репаративного остеогенезу [64–66]. Саме вона формує у місці перелому тканинний каркас для репаративного процесу та є джерелом гематопоетичних клітин. За рахунок цитокінів та факторів росту відбувається забезпечення міграції і проліферації клітинних елементів, зумовлюючи початок репаративних процесів та утворення сполучно-тканинного мозоля [65]. Проте за проведення остеосинтезу, виникає необхідність втручання у біологію природних механізмів, оскільки під час репозиції відбувається зрушення кісток та їх уламків. Порушується фіксація первинно сформованих кров'яних згустків, які забезпечують контакт країв уламків [64–66]. Гематому видаляють, а з нею і дрібні кісткові частинки, які неможливо зафіксувати. При цьому відбувається обмеження реалізації механізмів ендоостальної та інтрамембранної осифікації.

Як свідчать літературні джерела [155, 176, 205, 242, 253] реалізація біологічних властивостей тромбоцитів в умовах консолідації переломів різних типів залежить не тільки від концентрації в матеріалах тромбоцитів, а й від їх



форми. Тобто, наслідки osteoімплантації PRP-матеріалів у вигляді рідини чи гелеподібної консистенції (PRP з використанням низки активаторів) або ж ін'єкційної форми PRF чи щільного згустку фібрину, збагачених тромбоцитами, можуть бути не завжди однозначними. Істотною мірою реалізація їх біологічних властивостей залежить і від величини міжуламкового простору, зокрема, від наявності різних за об'ємом кісткових дефектів. Тобто за невеликого діастазу кісткових уламків фібринові матриці з великою концентрацією тромбоцитів можуть виконувати osteoкондуктивну функцію [83, 337]. Однак у випадку великих за об'ємом кісткових дефектів існує обмеження, яке, в першу чергу, полягає в необхідності отримання достатньої кількості ауто-PRP-матеріалів для забезпечення кондуктивних властивостей, оскільки вони не можуть виконати повноцінну функцію підтримки та надання жорсткості ділянці перелому. Власне це є підставою для композитного використання кальцій-фосфатної кераміки як osteoкондуктивного матеріалу, із тромбоцитарними концентратами.

Безперечним і нагальним завданням доклінічних досліджень була необхідність визначення можливого впливу PRP-матеріалів на загальну реакцію крові та динаміку біохімічних показників. При цьому однозначним виявилось те, що ксенологічний фібрин, збагачений тромбоцитами, незважаючи на інформацію [87, 211], про його позитивні ефекти, не може бути використаний в якості osteoіндуктора самостійно, так і у вигляді композитного матеріалу, оскільки після його імплантації у кролів встановлено низку негативних гематологічних реакцій. Зокрема, це найбільш виражений рівень еритроцитопенії в ранні терміни репаративного osteoгенезу, тривалу реакцію гострої фази з підвищеним рівнем гаптоглобіну до 21-ої доби, порівняно з показником клінічно здорових тварин та решти груп, та найменшим серед них вмістом у крові NO, що є свідченням недостатньої інтенсивності ендотеліальної реакції. Водночас у ранній (на 3–7-му добу) посттравматичний період унаслідок імплантації ксенологічного PRF osteoрезорбція набувала перманентного характеру, а процеси osteoгенезу, за

рівнем активності кісткової лужної фосфатази, відтерміновувалися в часі (21–42-а доба), що у відповідності до динаміки активності загальної лужної фосфатази зумовлювалося тривалою та інтенсивною запально-резорбтивною стадією репаративного остеогенезу. Однак найбільш об'єктивною виявилася гістологічна оцінка, за якої на 42-гу добу значні ділянки гіалінової хрящової тканини, чого в інших групах не відмічали, свідчили про загальмовані процеси репаративної регенерації та про гіперергічний перебіг запально-резорбтивної стадії, затримку проліферативних процесів на стадії хрящового мозоля.

Здебільшого попередні дослідники [85, 87, 191, 222–224, 246] оцінювали переважно вплив окремих форм PRP-матеріалів на регенерацію кісткової тканини. Проте комплексної оцінки, в порівняльному аспекті, за репаративного остеогенезу не було проведено. У зв'язку з цим у представленому дослідженні проаналізовано його перебіг та ступінь впливу на нього різних форм PRP-матеріалів за клініко-рентгенологічними, гематологічними, біохімічними та гістологічними показниками на модельних переломах у кролів. Хоча в цілому була доведена подібність у динаміці перебігу репаративного остеогенезу, однак, були виявлені наступні відмінності. Зокрема, порівняно з PRP, щільні форми PRF суттєво вирізнялися. За їх використання клініко-рентгенологічно відмічали більшу зону підвищеної рентгенощільності з її подовженням на кістково-мозковий канал діафіза, макроморфологічно у компактній і губчастій речовині кісткової тканини реакція періосту порівняно з PRP була меншою, а гістологічним дослідженням встановлено щільніше розміщення остеонів, регенеровані трабекули губчастої речовини мали значно більшу товщину та об'єм, що відображає інтенсивний остеогенез, неоангіогенез та, відповідно, ремоделювання кісткового регенерату.

При чому це підтверджувалося динамікою гематологічних показників, які супроводжувалися усуненням помірної посттравматичної еритроцитопенії до 14-ої доби репаративного остеогенезу з позитивною динамікою вмісту в крові гемоглобіну. Ключовими серед біохімічних показників були оцінка

маркерів кісткового метаболізму, яка характеризувалася раннім, уже на 3-ю добу, підвищенням активності кісткової лужної фосфатази з наступним її піком на 14-ту добу, а також підвищенням рівня в крові NO за osteoімплантації ауто-PRF та і-PRF з піками на 3-ю та 21–42-гу добу, що дало підставу для використання в якості компонента композитного матеріалу саме щільних форм тромбоцитарних концентратів. Це дозволило обґрунтувати використання такого композитного матеріалу, оцінити його вплив у модельних переломах кісткової тканини. За сукупністю досліджень було встановлено, що композитне використання щільних форм тромбоцитарних концентратів викликає активний перерозподіл макроелементів, інтенсивний остеогенез і помірну остеорезорбцію за ремоделювання кісткового регенерату, що в цілому забезпечує оптимізовану консолідацію модельного перелому. Це підтверджується динамікою кісткових маркерів остеогенезу та остеорезорбції. Особливо слід звернути увагу на те, що використання ауто-PRF чи композитного остеозаміщення має ще один пік активності тартрат-резистентної кислої фосфатази зі збільшенням у 2,7–3,5 рази ( $p < 0,001$ ) на 42-гу добу, що відображає раннє ремоделювання кісткового регенерату як заключної стадії репаративного остеогенезу.

Таким чином, за сукупністю клініко-рентгенологічних, макроморфологічних, гістологічних, гематологічних та біохімічних показників можна охарактеризувати тромбоцитарні концентрати за впливом на репаративний остеогенез та поставити їх у наступній послідовності: ксенологічний PRF < кров'яний згусток < PRP < і-PRF < PRF < PRF+HA/β-TCP-700.

Проведений моніторинг дозволив визначити перспективність ін'єкційних та щільних форм, як індукторів остеогенезу, за неосколкових переломів та довести, що у випадку його композитного використання останні надають кальцій-фосфатним матеріалам osteoіндуктивних та osteогенних властивостей.

В цілому це стало підставою для клінічного обґрунтування імплантації PRF-форм чи їх композитного остеозаміщення за безосколкових та осколкових переломів у собак. За останніх зв'язок кісткових уламків із м'якими тканинами був частково втрачений, а діастаз між кістковими уламками внаслідок ретракції та спазму м'язів виявився більшим 3 мм, по лінії перелому вони мали кісткові дефекти, що в цілому також було факторами ризику ускладненого перебігу репаративного остеогенезу.

Крім того, у випадку простих неосколкових переломів виникає необхідність у оновленні остеоіндуктивності кісткових уламків материнської кістки [39, 103, 253–255], що було реалізовано у першій дослідній групі.

Осколкові переломи є більш проблематичними у лікуванні. Також при цьому частота розвитку ускладнень істотно вища. Це пов'язано не тільки з методом остеосинтезу, а ще і з утворенням кісткових дефектів, які виникають після видалення нежиттєздатних осколків та викликають або супроводжуються порушенням пері- та ендоостального живлення кістки і, відповідно, як наслідок, зниженням або втратою регенеративного потенціалу, що зумовлює збільшення об'єму деструктивних змін, розвиток інфекційно-запальних та імунопатологічних процесів у травмованих тканинах, ступінь яких залежить від складності травми і впливає на тип консолидації переломів та динаміку перебігу її стадій [91, 254].

Як показали клініко-рентгенологічні результати, остеозаміщення різними формами PRF та кальцій фосфатною керамікою з властивостями PRF сприяє скороченню терміну запально-резорбтивної фази та прискоренню консолидації переломів, порівняно з використанням лише накісткового остеосинтезу, в 1,3 та в 1,5 рази ( $p < 0,001$ ), при чому за таких переломів переважно за рахунок ендоостального остеогенезу. При цьому за відсутності заміщення кісткових дефектів терміни консолидації переломів, навпаки, подовжуються з посиленням проліферації пері- та ендоосту.

Гематологічно застосування імплантованих матеріалів відображається зменшенням прояву посттравматичної анемії, яка усувається на 21-шу добу

репаративного остеогенезу, а також інтенсивності та тривалості лейкоцитарної реакції, у порівнянні з контрольною групою. Також це супроводжується достовірно меншим рівнем активності ЗЛФ, як маркера гострої фази, на 21-шу добу та його нормалізацією на 42-гу добу, перманентним підвищенням активності КЛФ впродовж всього терміну спостереження за репаративним остеогенезом з піком на 14-шу за додаткової імплантації PRF-матеріалів та на 7–14-ту добу за остеозаміщення композитним PRF-керамічним матеріалом, що є свідченням інтенсивного остеогенезу. Крім того, активність ТрКФ характеризує ранню запальну остеорезорбцію за використання цих матеріалів, без якої неможливий остеогенез та репаративне ремоделювання кісткових регенератів, і у разі імплантації PRF-керамічного матеріалу, це відображає остеointegraційні процеси кальцій-фосфатної кераміки. А динаміка макроелементів та Ca : P співвідношення, може свідчити про їх інтенсивний перерозподіл у межах кісткової системи у період мінералізації кісткового регенерату, а за композитного остеозаміщення частково є відображенням остеointegraції та остеорезорбції кальцій-фосфатної кераміки. В цілому це свідчить про ранню остеобластичну реакцію, а також менший та оптимізований рівень остеорезорбтивних процесів, раннє ремоделювання кісткового регенерату. Крім того підвищені рівні оксиду азоту за PRF-імплантації та 7-му і 21-шу добу за композитного остеозаміщення, відображають osteoіндуктивність імплантованих матеріалів та здатність до стимулювання неоангіогенезу на різних стадіях репаративного остеогенезу.

Таким чином, проблематика досягнення раціонального репаративного остеогенезу за переломів різних типів кісток, як доводять результати досліджень може бути частково вирішена використанням PRP-матеріалів з osteoіндуктивними властивостями та широкоживаної на сьогоднішній день кальцій-фосфатної кераміки з osteoкондуктивними властивостями.

Певною мірою вирішена технологічна проблема, а саме, встановлені оптимальні умови центрифугування зразків крові, що дозволяє в умовах

звичайної лабораторії або клініки одержати аутобіоматеріали, які містять достатню кількість тромбоцитів.

Встановлені місця концентрації основної маси тромбоцитів у згустках та рідких формах, що робить більш обґрунтованим їх дозування для використання у ветеринарній ортопедії.

Проведений всебічний аналіз впливу різних типів PRP-матеріалів на репаративний остеогенез дозволив достовірно та об'єктивно обрати раціональні форми тромбоцитарних концентратів, які зумовлюють прискорення репаративного остеогенезу за рахунок випуску факторів росту із  $\alpha$ -гранул тромбоцитів [71, 182, 183], що засвідчено не лише клініко-рентгенологічними дослідженнями, а також оцінкою реакції крові, показниками метаболізму кісткової тканини. На підставі всебічної оцінки різних форм матеріалів визначені найбільш перспективні з них із вираженою реалізацією остеоіндуктивного потенціалу тромбоцитів та фібрину, який не тільки виступає у якості каркасу, в який інфільтруються клітини, а й забезпечує модуляцію клітин імунної системи у процесі відновлення пошкоджених тканин [82]. Фібрин не тільки підвищує адгезивність кераміки, а й сприяє реалізації тромбоцитами своїх властивостей [82, 215–217]. У дослідженні позитивний вплив PRP-матеріалів на репаративний остеогенез доведений, обґрунтований і дає можливість достатньо ефективного їх використання за різних типів переломів у собак, що в цілому дозволяє оптимізувати консолідацію переломів і створює перспективи для подальшого розвитку принципів і засобів регенеративної медицини у ветеринарній травматології та ортопедії.

## ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі клініко-експериментально обґрунтовано імплантацію у міжуламкові простори різних форм збагаченого тромбоцитами аутофібрину та його композиту з кальцій-фосфатною керамікою для остеозаміщення, що є новим у вирішенні проблеми оптимізації консолідації різних типів переломів довгих трубчастих кісток у собак. Доведено, що оптимальна концентрація тромбоцитів у ауто-PRP-матеріалах досягається центрифугуванням зразків крові за 100–400 g протягом 3–10 хв, за якої після імплантації у кісткові дефекти реалізуються їх остеоіндуктивні властивості з індукцією неоангіогенезу та формуванням ранньої остеобластичної реакції, а за композитного остеозаміщення і пластинчастої кісткової тканини, що також підтверджується реактивним тромбоцитозом, фазовими піками оксиду азоту та біохімічних маркерів кісткового метаболізму, усуненням дисбалансу між остеорезорбтивними і остеогенними процесами репаративного остеогенезу. На підставі цього обґрунтовано імплантацію ін'єкційного PRF та щільної форми PRF за неосколкових та композиту кальцій-фосфатної кераміки з PRF за осколкових переломів у собак, що за умов накісткового остеосинтезу прискорює їх консолідацію відповідно в 1,3 і 1,5 раза.

2. Встановлено, що в діапазоні 100–1843 g відцентрової сили центрифугування зразків крові найбільша концентрація тромбоцитів у одержаній плазмі кролів досягається за 100 g протягом 3 хв –  $824 \pm 30,4$  Г/л, та 400 g (10 хв) –  $550 \pm 21,2$  Г/л, за їх умісту в цільній крові –  $210 \pm 9,6$  Г/л ( $p < 0,001$ ). При цьому зі збільшенням цієї величини за 10 хв вміст тромбоцитів у плазмі крові динамічно зменшується від  $322 \pm 18,8$  Г/л за 735 g до  $20 \pm 4,5$  Г/л за 1843 g ( $p < 0,001$ ).

3. Макроморфологічно довжина згустків фібрину за центрифугування зразків крові в діапазоні 100–1843 g відцентрової сили збільшується з  $0,31 \pm 0,02$  до  $1,48 \pm 0,03$  см ( $p < 0,001$ ) із гістологічно рівномірним розподілом тромбоцитів у фібринових згустках одержаних за 400 g, що загалом

обґрунтовує оптимальні режими центрифугування зразків крові для одержання плазми чи фібрину, збагачених тромбоцитами, в діапазоні 100–400 g.

4. Клініко-рентгенологічно імплантація PRP-матеріалів у кісткові дефекти компактної чи губчастої кістки у кролів характеризується, порівняно з їх загоєнням під кров'яним згустком, ранньою пери- і ендостальною реакціями з формуванням остеоїда різного ступеня рентгенощільності (14-та проти 21-ї доби у контролі), що відбувається у випадку композитного остеозаміщення переважно завдяки ендосту з точковим остеосклерозом уже на 21-шу добу. Однак за імплантації ксенологічного PRF спостерігаються тривалі запально-резорбтивні явища, рентгенонегативність кісткового дефекту навіть на 42-гу добу із зоною підвищеної рентгенощільності навколо нього. При цьому за імплантації ауто-PRF чи композитного остеозаміщення макроморфологічні показники щільності кісткових регенератів та їх зв'язку з материнською кісткою більші, ніж у контрольних, в 1,3–1,4 ( $p < 0,05$ ) та 1,3–1,8 ( $p < 0,01–0,001$ ) рази, відповідно.

5. Гістоморфологічно особливості репаративного остеогенезу в кролів за імплантації у кісткові дефекти ауто-PRF-матеріалів характеризуються більш ранньою (порівняно з контролем на 7 діб) остеобластичною реакцією з формуванням елементів губчастої кісткової тканини на 14-ту добу та остеонів на 42-гу, а у випадку ксено-PRF спостерігається надмірна та подовжена у часі до 42-ї доби хондрійна реакція, тимчасом за композитного остеозаміщення – ранніми остеобластичною реакцією та неоангіогенезом з формуванням елементів пластинчастої кісткової тканини і зокрема в межах гранул (14-та доба) з поступовою їх біодеградацією і утворенням остеонів (21-ша доба). За бальною оцінкою гістоморфологічних критеріїв ауто-і-PRF прискорює репаративний остеогенез в 1,1–1,2 рази ( $p < 0,05–0,01$ ), ауто-PRF – в 1,3 ( $p < 0,01$ ), його композиція з кальцій-фосфатною керамікою – в 1,3–1,4 рази ( $p < 0,01$ ) залежно від типу кісткової тканини, а за сукупністю клініко-рентгенологічних, макро- і гістоморфологічних ознак PRP-матеріали щодо



ефективності впливу на репаративний остеогенез розміщуються в наступній послідовності: PRP<i-PRF<PRF<PRF+HA/β-TCP.

6. Імплантація у кісткові дефекти трубчастих кісток у кролів PRP-матеріалів супроводжується усуненням помірної посттравматичної еритроцитопенії (глибшої у разі ксенологічного PRF) до 14-ї доби репаративного остеогенезу з позитивною динамікою вмісту в крові гемоглобіну та динамічним підвищенням кількості в крові еритроцитів у 1,1–1,2 раза ( $p<0,01$ ) за остеозаміщення PRF+HA/β-TCP–700 у період 14–42-ї діб. Водночас набуває розвитку реактивний тромбоцитоз, особливо виражений впродовж 7–14-ї доби у разі використання PRF та з піками на 3- і 14-ту добу – за PRF+HA/β-TCP–700, що є свідченням реалізації впливу їх компонентів на кісткову регенерацію.

7. Реакція гострої фази за імплантації PRP-матеріалів у кісткові дефекти кролів характеризується двофазною гаптоглобінемією на 3- та 14-ту добу, менш інтенсивну за використання PRF та композитного остеозаміщення (підвищення лише в 1,1–1,2 раза, а в решті випадків у 1,3–1,5 раза,  $p<0,001$ ), з адаптивними змінами в ранній посттравматичний період концентрації альбуміну, позитивною динамікою рівня загального білка та усуненням гіперкоагуляційного синдрому вже на 14-ту добу репаративного остеогенезу.

8. Загоєння дефектів трубчастих кісток у кролів під кров'яним згустком та за імплантації PRP супроводжується перманентним підвищенням рівня в крові NO з піком на 14-ту добу репаративного остеогенезу, за ксенологічного PRF – помірним упродовж усіх термінів, за ауто-PRF та i-PRF – з піками на 3-тю та 21–42-гу добу, а за композитного остеозаміщення – на 14- та 42-гу добу, що відображає інтенсивний неоангіогенез та відповідно ремоделювання кісткового регенерату.

9. Імплантація у кісткові дефекти кролів PRF-матеріалів чи їх композитної форми супроводжується раннім, уже на 3-тю добу, підвищенням активності кісткової лужної фосфатази з наступним її піком на 14-ту, а за остеозаміщення PRF-умісним керамічним композитом – 7–14-ту та 42-гу добу,

що відображає інтенсивність процесів остеогенезу та раннього ремоделювання кісткових регенератів, які помірні за імплантації PRP, а у випадках загоєння під кров'яним згустком та за використання ксено-PRF відтерміновані в часі (21–42-га доба) і відповідно до динаміки активності загальної лужної фосфатази містять суттєвий запально-резорбтивний компонент.

10. У будь-якому випадку загоєння кісткових дефектів у кролів характеризується в ранній (на 3–7-му добу) посттравматичний період остеорезорбцією з підвищенням активності її маркера тартрат-резистентної кислоти фосфатази в 3,5–3,7 раза ( $p < 0,001$ ), яка у контрольній групі та за імплантації ксено-PRF має помірний і перманентний стан, а за використання ауто-PRF чи композитного остеозаміщення має ще один пік зі збільшенням у 2,7–3,5 раза ( $p < 0,001$ ) на 42-гу добу, що відображає динамічну зміну стадій репаративного остеогенезу. При цьому композитне остеозаміщення за двофазністю збільшення індекса Петерсона та найменшого в період 7–21-ї доби фосфатазного індекса супроводжується активним перерозподілом макроелементів, інтенсивним остеогенезом і помірною остеорезорбцією за ремоделювання кісткового регенерату, що загалом забезпечує оптимізовану консолідацію модельного перелому.

11. Консолідація переломів довгих трубчастих кісток у собак після накісткового остеосинтезу супроводжується тривалою еритроцитопенією і лейкоцитарною реакцією (впродовж 42-х діб), фізіологічною гіпоальбумінемією (до 14-ї доби) та гіперкоагуляційним синдромом з дефіцитом антитромбінової активності (до 21-ї доби), які за PRF-остеоімплантації чи композитного остеозаміщення усуваються на 21-шу, 14-, 7- та 14-ту добу, відповідно, без змін концентрації імунорегуляторного інгібітора  $\alpha_2$ -макроглобуліну та з помірною гаптоглобінемією.

12. Накістковий остеосинтез за переломів трубчастих кісток у собак характеризується підвищеним рівнем у сироватці крові оксиду азоту впродовж 3-ї (в 1,5 раза,  $p < 0,001$ ) та 7-ої діб (у 1,3 раза,  $p < 0,001$ ), який за використання

імплантаційних матеріалів збільшується в 1,5–1,9 рази ( $p < 0,001$ ) в період з 7- до 42-ї доби з піками на 21-шу за PRF-імплантації та 7- і 21-шу добу за композитного остеозаміщення, що відображає їх остеоіндуктивність та інтенсивність неоангіогенезу на різних стадіях репаративного остеогенезу.

13. Консолідація переломів довгих трубчастих кісток у собак в умовах накісткового остеосинтезу супроводжується піками активності в сироватці крові загальної лужної фосфатази на 3- та 21-шу добу з достовірно меншим її рівнем і нормалізацією на 42-гу добу в разі застосування PRF-матеріалів, перманентним підвищенням активності її кісткового ізоферменту (маркер остеогенезу) з піком на 21- та 14-ту добу, відповідно, за імплантації і-PRF чи PRF і на 7–14-ту за композитного остеозаміщення, формуванням піку активності тартрат-резистентної кислої фосфатази (маркер остеорезорбції) на 42-гу добу в разі остеосинтезу та на 21–42-гу за додаткової імплантації PRF-матеріалів і на 14–21-шу за композитного остеозаміщення. Це свідчить про ранню остеобластичну реакцію, менший та оптимізований рівень остеорезорбтивних процесів, раннє ремоделювання кісткового регенерату, що також узгоджується з динамікою перерозподілу в межах кісткової системи Ca і P за зміною величини їх співвідношення.

14. Імплантація і-PRF чи PRF у міжуламкові простори за неосколкових та остеозаміщення композитом кальцій-фосфатної кераміки з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак скорочує терміни клініко-рентгенологічно підтвердженої їх консолідації порівняно з використанням лише накісткового остеосинтезу в 1,3 та 1,5 рази ( $p < 0,001$ ). При цьому рентгенологічна візуалізація та динаміка біохімічних маркерів кісткового метаболізму засвідчують менший рівень запально-резорбтивних процесів у ділянці кісткової травми та раннє і динамічне формування кісткового регенерату завдяки ендоостальному остеогенезу, особливо у випадку композитного остеозаміщення.

## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. За приготування різних форм PRP-матеріалів пропонуємо використовувати наступні параметри центрифугування зразків крові: для одержання ін'єкційної форми фібрину, збагаченого тромбоцитами, за величини відцентрової сили 100 g (3 хв); а для щільної форми PRF – 400 g (10 хв).

2. У собак з безосколковими переломами довгих трубчастих кісток доцільно за накісткового остеосинтезу додатково проводити імплантацію в міжуламкові простори ін'єкційної або ж щільної форми аутологічного фібрину, що забезпечує остеоіндукцію в ділянці кісткової травми і прискорює консолідацію переломів у 1,5 раза, що апробовано в клініках дрібних тварин України (додаток А2, А4).

3. У собак з осколковими переломами довгих трубчастих кісток під час накісткового остеосинтезу необхідно проводити остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою у комбінації з фібрином, збагаченим тромбоцитами, яке забезпечує остеокондуктивність у ділянці травми і відновлення регенеративного потенціалу кісткової тканини з меншою інтенсивністю запально-остеорезорбтивних процесів та скороченням термінів консолідації переломів у 1,5 раза, що апробовано в низці клінік ветеринарної медицини України (додаток А3).

4. Результати клініко-експериментальних досліджень щодо методів приготування різних форм ауто-PRP-матеріалів та їх застосування в умовах накісткового остеосинтезу в собак з безосколковими переломами та імплантації ін'єкційної або щільної форми аутологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами, а також за остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою у поєднанні з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за осколкових переломів доцільно використовувати у викладанні дисциплін «Загальна і спеціальна ветеринарна хірургія» та «Травматологія і ортопедія дрібних домашніх тварин», «Ветеринарна хірургія», «Хвороби собак і котів», «Хвороби дрібних

тварин», «Хірургічні хвороби тварин з анестезіологією» на факультетах ветеринарної медицини вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації (додаток А5, А6, А9–А12).

5. Розроблені та рекомендовані до практичного використання методики приготування PRP-матеріалів і способи їх застосування висвітлені у методичних рекомендаціях «Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині» (С.М. Шевченко, М.В. Рубленко. Біла церква: БНАУ, 2022. 23 с.), затверджені на засіданні Вченої ради факультету ветеринарної медицини БНАУ протокол №10 від 26 червня 2022 року (додаток А1).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Рубленко С. В., Єрошенко О. В. Моніторинг ветеринарної допомоги і структура хірургічної патології серед дрібних домашніх тварин в умовах міської клініки. *Вісник Сумського НАУ*. 2012. № 1. (30). С. 150–154.
2. Amin A., Amin A. The Effect of the Hydroxyapatite and Hydroxyapatite Doped by Magnesium on Healing of Fracture in Dogs. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2020. Vol. 38, no. 2. P. 47–51. URL: <https://doi.org/10.21608/bvmj.2020.28949.1202>
3. Використання композитних матеріалів за переломів трубчастих кісток у тварин / М. В. Рубленко, В. Г. Андрієць, С. А. Семеняк та ін. Біла Церква. 2015. 86 с.
4. Перспективи розвитку клітинних технологій у ветеринарній медицині / А. Й Мазуркевич та ін. *Вісник аграрної науки*. 2017. С. 34 – 40.
5. Thanoon M. G., Eesa M. J., Alkenanny E. R. Histopathological evaluation of the platelets rich fibrin and bone marrow on healing of experimental induced distal radial fracture in local dogs. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 2019. Vol. 43(1). P. 11–20.
6. Higgs J., Derbyshire E., Styles K. Nutrition and osteoporosis prevention for the orthopaedic surgeon. *EFORT Open Reviews*. 2017. Vol. 2. № 6. P. 300–308. DOI: 10.1302/2058-5241.2.160079
7. Рубленко М. В., Дудка В. Б., Семеняк С. А. Морфо-рентгенологічна і біохімічна характеристика репаративного остеогенезу за заміщення кісткових дефектів Біоміном-ГТ у тварин. *Вісник Білоцерків. нац. аграр. ун-ту*. 2015. № 1 (118). С. 98–106.
8. Maritato K. C., Rovesti G. L. Minimally Invasive Osteosynthesis Techniques for Humerus Fractures. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2020. Vol. 50. № 1. P. 123–134. doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.08.005
9. Serem E. K., Mande J. D. A Retrospective Study of the Incidence, Age, Breed Predisposition and Types of Fractures in Household Dogs in Nairobi County,

Kenya. *International Journal of Veterinary Science*. 2020. Vol. 9(1). P. 111–115.

10. Семеняк С. А., Рубленко С. В., Данилейко Ю. М. Структура переломів у собак у свідомості мегаполісу. *Вісник Білоцерківського Державного аграрного університету*. 2014. Вип. 108(13). С. 218–223. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvvm\\_2014\\_13\\_62](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvvm_2014_13_62)

11. Телятніков А. В. Поширення переломів кісток у собак. *Науковий вісник ветеринарної медицини: Зб. наук. праць*. 2013. Вип. 11 (101). С. 149–153.

12. Пустовіт Р. В. Характеристика переломів трубчастих кісток у дрібних домашніх тварин. *Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 2007. Вип. 44. С. 124–127.

13. Сухонос В. П., Кисельов І. Г. Моніторинг травматизму дрібних домашніх тварин в умовах міста. *Вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького*. 2013. Вип. 3. Т. 15. С. 329–332.

14. Ільницький М. Г. Смурна О. В. Особливості остеогенезу та репаративної регенерації кісток таза у собак. *Вет. медицина України*. 2007. Вип. 7. С. 35–37.

15. Білий Д. Д., Грищенко М. Ю. Моніторинг переломів довгих трубчастих кісток у собак в умовах міста Дніпропетровськ. Науково-технічний бюлетень *Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету*. 2016. Вип. 4, № 2. С. 7–12. Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/ndbnndc\\_2016\\_4\\_2\\_3](http://nbuv.gov.ua/UJRN/ndbnndc_2016_4_2_3)

16. Новіцький В. О., Слюсаренко Д. В. Особливості діагностики та лікування нестабільності крижово-клубового суглобу у собак. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2020. С. 105–109. Doi:10.31890/vttp.2020.05.19

17. Хомин Н. М., Мисак А. Р., Дмитрієв В. С. Моніторинг переломів кісток у собак. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С. З. Гжицького*. 2015. Вип. 17.

№ 2. С. 259–264.

18.. Структура осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак за принципами класифікації АО/ASIF в (24-и клінічні випадки) / С. В Рубленко та ін. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2022. Вип. 1. С. 179–187.

19. Evaluation of intramedullary pinning technique for management of tibia fractures in dogs / T. Singh et al. *The Pharma Innovation Journal*. 2019. Vol. 8(2). P. 291–297. [www.thepharmajournal.com](http://www.thepharmajournal.com)

20. Raouf M. A. E., Ezzeldein S. A., Eisa E. Bone fractures in dogs: A retrospective study of 129 dogs. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 33(2). P. 401–405. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.163086>

21. Calcaneal Fractures in Non-Racing Dogs and Cats: Complications, Outcome, and Associated Risk Factors / K. L. Perry et al. *Veterinary Surgery*. 2016. Vol. 46, no. 1. P. 39–51. URL: <https://doi.org/10.1111/vsu.12575>

22. Incidence of fracture in dog: A retrospective study / R. Jain. et al. *Veterinary Practitioner*. 2018. Vol. 19(1). P. 63–65 URL: <http://www.vetpract.in/.../>

23. Lovric L., Kreszinger M., Pecin M. Surgical Treatment of Canine Femoral Fractures - a Review. *Journal of World's Poultry Research*. 2020. Vol. 10, no. 2. P. 137–145. URL: <https://doi.org/10.36380/scil.2020.wvj18>

24. Appendicular fractures of traumatic etiology in dogs: 955 cases (2004-2013) / R. d. N. Libardoni et al. *Ciência Rural*. 2015. Vol. 46, no. 3. P. 542–546. URL: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150219>

25. Surgical Treatments for Canine Anterior Cruciate Ligament Rupture: Assessing Functional Recovery Through Multibody Comparative Analysis / G. Putame et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00180>;

26. Franklin S. P., Burke E. E., Holmes S. P. The effect of platelet-rich plasma on osseous healing in dogs undergoing high tibial osteotomy. *PLOS ONE*. 2017. Vol. 12, no. 5. P. e0177597. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177597>

27. Matres-Lorenzo L., McAlinden, A., Bernardé A., & Bernard F. Control of



hemorrhage through the osteotomy gap during tibial plateau leveling osteotomy: 9 cases. *Veterinary Surgery*. 2018. Vol. 47(1). P. 60–65. <https://doi.org/10.1111/vsu.12749>

28. Demko J., McLaughlin R. Developmental orthopedic disease. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 2005. Vol. 35. P. 1111–1135. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2005.05.002>

29. Prevalence of canine hip dysplasia in 17 breeds in France, a retrospective study of the 1993–2019 radiographic screening period / J. P. Genevois et al. *Revue Vétérinaire Clinique*. 2020. Vol. 55, no. 4. P. 123–146. URL: <https://doi.org/10.1016/j.anicom.2020.09.003>.

30. Narojek T., Fiszdon K., Hanysz E. Canine elbow dysplasia in different breeds. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2008. Vol. 52 (1). P. 169–173. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-53649101973&partnerID=40&md5=0abcbda8157076d49bdaeea6dd879279>

31. Petazzoni M., Buiatti M., Mortellaro C. M. Periprosthetic fracture in a cat [Frattura periprotetica di femore in un gatto]. *Veterinaria*. 2016. Vol. 30(6). P. 375–383.

32. Sadan M. A., Amort K., Kramer M. Pelvic Floor Fractures in 55 Dogs and 39 Cats: CT and X- Ray Findings. *International Journal of Veterinary Sciences Research*. 2016. Vol. 2, no. 1. P. 1–7. URL: <https://doi.org/10.18488/journal.110/2016.2.1/110.1.1.7>

33. Оцінка використання гідроксиапатитної кераміки, легованої кремнієм, для лікування осколкових переломів кісток у собак / М. Рубленко та ін. *Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*. 2020. № 22(99). С. 29–37. Doi: 10.32718/nvlvet9905

34. Histological study of the docking site after bone transport. Temporal evolution in a sheep model / E. M. López-Pliego et al. *Injury*. 2018. Vol. 49, no. 11. P. 1987–1992. URL: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2018.09.028>

35. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics / F. Gasthuys et al. *Veterinary and Comparative*

*Orthopaedics and Traumatology*. 2010. Vol. 23, no. 03. P. 153–162. URL: <https://doi.org/10.3415/vcot-09-03-0038>

36. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis / A. N. Ball et al. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2018. Vol. 36, no. 6. P. 1559–1572. URL: <https://doi.org/10.1002/jor.23845>

37. The biology and treatment of acute long-bones diaphyseal fractures: Overview of the current options for bone healing enhancement / G. Marongiu et al. *Bone Reports*. 2020. Vol. 12. P. 100249. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100249>

38. Outcome of nonunion fractures in dogs treated with fixation, compression resistant matrix, and recombinant human bone morphogenetic protein-2 / A. Massie et al. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 2017. Vol. 30, no. 02. P. 153–159. URL: <https://doi.org/10.3415/vcot-16-05-0082>

39. Dülgeroglu T. C., Metineren H. Evaluation of the Effect of Platelet-Rich Fibrin on Long Bone Healing: An Experimental Rat Model. *Orthopedics*. 2017. Vol. 40, no. 3. P. e479-e484. URL: <https://doi.org/10.3928/01477447-20170308-02>

40. Dmitrijev V. S., Khomyn N. M. Application of means of stimulation of regenerative osteogenesis for complex treatment of dogs with fractures of the limb bones. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2018. Vol. 20, no. 92. P. 156–160. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9232>

41. Arthurs G. I., Langley-Hobbs S. J. Complications Associated with Corrective Surgery for Patellar Luxation in 109 Dogs. *Veterinary Surgery*. 2006. Vol. 35, no. 6. P. 559–566. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.2006.00189.x>

42 Пустовіт Р. В., Рубленко М. В. Застосування тіотриазоліну та нуклеїнату натрію для корекції гомеостазу і стимуляції загоєння переломів трубчастих кісток у собак. *Вісник Білоцерківськ. держ. аграрн. ун-ту. Зб. наук. праць*. 2007. Вип. 48. С. 72–76.

43 Рубленко М. В., Шаганенко В. С. Патогенетична роль оксиду азоту в умовах запально-репаративного процесу при переломах трубчастих кісток у собак та його корекція Імуном-депо. *Біологія тварин*. 2011. № 1–2, Т. 13. С.

340–346.

44 Induction of bone formation in abdominal implants constituted by collagen sponges embedded with plant-based human transforming growth factor family proteins in ectopic dog model / J. C. Jacinto-Tinajero et al. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2014. Vol. 1, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40634-014-0011-z>

45. Inflammation-Induced Osteogenesis in a Rabbit Tibia Model / M. Croes et al. *Tissue engineering*. 2017. Vol. 23(11). P. 73–685. doi: 10.1089/ten.tec.2017.0151

46. Objective Comparison between Platelet Rich Plasma Alone and in Combination with Physical Therapy in Dogs with Osteoarthritis Caused by Hip Dysplasia / B. Cuervo et al. *Animals (Basel)*. 2020. Vol. 10(2). 175. doi: 10.3390/ani10020175

47. Stevens M. M. Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*. 2008. Vol. 11. P. 18–25. doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5.

48. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions / A. Oryan et al. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014. Vol. 9, no. 1. P. 18. URL: <https://doi.org/10.1186/1749-799x-9-18>

49. Effect of Hydroxyapatite Formation on Titanium Surface with Bone Morphogenetic Protein-2 Loading through Electrochemical Deposition on MG-63 Cells / H. Huang et al. *Materials*. 2018. Vol. 11, no. 10. P. 1897. URL: <https://doi.org/10.3390/ma11101897>

50. Динаміка цитокінів при остеозному заміщенні осколкових переломів у собак гідроксиапатитовою керамікою, легованою кремнієм / М. Рубленко та ін. *Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*. 2021. Вип. 23 (102). С. 29–36. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10205>

51. Nano-biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol composites with enhanced bioactivity for bone repair via low-temperature three-dimensional printing and loading with platelet-rich fibrin / Y. Song et al. *International Journal of*

*Nanomedicine*. 2018. Vol. 13. P. 505–523. URL: <https://doi.org/10.2147/ijn.s152105>

52. Lu J., Yu H., Chen C. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. *RSC Advances*. 2018. Vol. 8, no. 4. P. 2015–2033. URL: <https://doi.org/10.1039/c7ra11278e>

53. Годосюк Т. П. Рентгено- та макроморфологічна оцінка репаративного остеогенезу за імплантації гідроксиапатитного композиту, легованого германієм. *Наук.вісник вет. медицини: зб-к наук. праць*. 2020. №2. С. 183–194. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-160-2-183-194>

54. Zinc-Based Biomaterials for Regeneration and Therapy / Y. Su et al. *Trends in Biotechnology*. 2019. Vol. 37, no. 4. P. 428–441. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.009>

55. Histopathological evaluation of polycaprolactone nanocomposite compared with tricalcium phosphate in bone healing / H. Eftekhari et al. *Journal of Veterinary Research*. 2018. Vol. 62, no. 3. P. 385–394. URL: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0055>

56. Особенности биоактивных покрытий на титановых имплантатах / Ульянович Н. В. и др. *Літопис травматології та ортопедії*. 2014. № 1-2. С. 76–79.

57. Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update / M. R. De Pascale et al. *Transfusion Medicine Reviews*. 2015. Vol. 29, no. 1. P. 52–61. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.11.001>

58. Chaparro O., Linero I. (2016). Regenerative Medicine: A New Paradigm in Bone Regeneration. *Advanced Techniques in Bone Regeneration*. 2016. <https://doi.org/10.5772/62523>

59. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair / F. Granero-Molto et al. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2008. Vol. 8, no. 3. P. 255–268. URL: <https://doi.org/10.1517/14712598.8.3.255>

60. Кордова кров та перспективи застосування її компонентів в практиці

ветеринарної хірургії / А. Й Краєвський та ін. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина»*. 2021. Вип 1. № 52. С. 25-30. URL: <http://repo.snau.edu.ua:8080/xmlui/handle/123456789/9512>

61. Scintigraphic Evaluation of Osseointegrative Response around Calcium Phosphate-Coated Titanium Implants in Tibia Bone: Effect of Platelet-Rich Plasma on Bone Healing in Dogs / К. Cho et al. *European Surgical Research*. 2013. Vol. 51. P. 138–145. doi: 10.1159/000357197

62. The Synergistic Effect of Leukocyte Platelet-Rich Fibrin and Micrometer/Nanometer Surface Texturing on Bone Healing around Immediately Placed Implants: An Experimental Study in Dogs / R. F. Neiva et al. *BioMed Research International*. 2016. Vol. 2016. P. 1–9.

URL: <https://doi.org/10.1155/2016/9507342>

63. Effects of mineral trioxide aggregate and platelet-rich fibrin on histological results of direct pulp capping in dogs / B. A. Ameghani et al. *Giornale Italiano Di Endodonzia*. 2021. Vol. 35(1).

<https://doi.org/10.32067/GIE.2021.35.01.01>

64. Yang Y., Xiao Y. Biomaterials Regulating Bone Hematoma for Osteogenesis. *Advanced Healthcare Materials*. 2020. Vol. 9, no. 23. P. 2000726. URL: <https://doi.org/10.1002/adhm.202000726>.

65. Bujoli B., Scimeca J.-C., Verron E. Fibrin as a Multipurpose Physiological Platform for Bone Tissue Engineering and Targeted Delivery of Bioactive Compounds. *Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, no. 11. P. 556. URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110556>

66. Osman K., Gabr A., Haddad F. S. Bone Healing. *General Orthopaedics and Basic Science*. Cham, 2019. P. 111–119. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92193-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92193-8_14)

67. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives / A. Ho-Shui-Ling et al. *Biomaterials*. 2018. Vol. 180. P. 143–162. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>

68. Inflammation and Bone Repair: From Particle Disease to Tissue Regeneration / S. B. Goodman et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00230>

69. Cellular biology of fracture healing / C. S. Bahney et al. *Journal of Orthopaedic Research*. 2018. Vol. 37, no. 1. P. 35–50. URL: <https://doi.org/10.1002/jor.24170>

70. Effect of implants of hydroxyapatite with tricalcium phosphates alloyed with Si on histomorphological and biochemical parameters in cases of bone defects of rabbits / V.O. Chemerovskiy et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. Vol. 12, no 2. P. 281–288. Doi: 10.15421/022137

71. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features / D. M. Dohan et al. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006. Vol. 101, no. 3. P. e45–e50. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009>

72. Application of whey protein isolate in bone regeneration: Effects on growth and osteogenic differentiation of bone-forming cells / T. E. L. Douglas et al. *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101, no. 1. P. 28–36. URL: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13119>

73. In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes / D. M. Dohan Ehrenfest et al. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012. Vol. 13, no. 7. P. 1131–1137. URL: <https://doi.org/10.2174/138920112800624328>

74. Preparation of highly-concentrated autologous platelet-rich plasma for biomedical use / V. Chernyshenko et al. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2019. Vol. 91, no. 2. P. 19–27. URL: <https://doi.org/10.15407/ubj91.02.019>

75. 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 / D. M. Dohan Ehrenfest et al. *Platelets*. 2017. Vol. 29, no. 2. P. 171–184. URL: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>

76. Proteomic Classification and Identification of Proteins Related to Tissue Healing of Platelet-Rich Plasma / H. W. Lee et al. *Clinics in Orthopedic Surgery*. 2020. Vol. 12, no. 1. P. 120. URL: <https://doi.org/10.4055/cios.2020.12.1.120>

77. Dohan Ehrenfest D. M., Rasmusson L., Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 2009. Vol. 27, no. 3. P. 158–167. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>

78. Bielecki T., M. Dohan Ehrenfest D. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): Surgical Adjuvants, Preparations for In Situ Regenerative Medicine and Tools for Tissue Engineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012. Vol. 13, no. 7. P. 1121–1130. URL: <https://doi.org/10.2174/138920112800624292>

79. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF / E. Kobayashi et al. *Clinical Oral Investigations*. 2016. Vol. 20, no. 9. P. 2353–2360. URL: <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1719-1>

80. Platelet-rich fibrin/ aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats / J. Du et al. *Journal of Periodontal Research*. 2017. Vol. 53, no. 1. P. 47–56. URL: <https://doi.org/10.1111/jre.12485>

81. Cytokine and Growth Factor Delivery from Implanted Platelet-Rich Fibrin Enhances Rabbit Achilles Tendon Healing / C.-C. Wong et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no. 9. P. 3221. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21093221>

82. Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration / E. Öncü et al. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016. Vol. 21, no. (5). P. e601–7. <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v21i5/medoralv21i5p601.pdf>

83. Study of platelet-rich fibrin combined with rat periodontal ligament stem cells in periodontal tissue regeneration / X. Duan et al. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018. Vol. 22(2). P. 1047–1055. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13461>

84. Kazemi D., Fakhrijou A. Leukocyte and Platelet Rich Plasma (L-PRP)

Versus Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) For Articular Cartilage Repair of the Knee: A Comparative Evaluation in an Animal Model. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2015. Vol. 17, no. 10. URL: <https://doi.org/10.5812/ircmj.19594>

85. Autologous platelet-rich fibrin stimulates canine periodontal regeneration / C. Kornuthisophon et al. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58732-x>

86. Preliminary Evaluation of Platelet Rich Fibrin-Mediated Tissue Repair in Immature Canine Pulpless Teeth / Q. L. Wang et al. *The Chinese Journal of Dental Research*. 2016. Vol. 19(1). P. 49–54. <https://doi.org/10.3290/j.cjdr.a35697>

87. Evaluation of the Use of Platelet-Rich Fibrin Xenologous Membranes Derived from Bubaline Blood in Canine Periodontal Defects / P. Banyatworakul et al. *Veterinary Sciences*. 2021. Vol. 8, no. 10. P. 210. URL: <https://doi.org/10.3390/vetsci8100210>

88. Platelet-Rich Plasma in Trauma Patients / M. Yaltirik et al. *Trauma in Dentistry*. 2019. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79966>

89. Method to obtain platelet-rich plasma from rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) / J. M. Pazzini et al. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016. Vol. 36, no. 1. P. 39–44. URL: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016000100007>

90. Семеняк С. А. Клініко-біохімічна характеристика репаративного остеогенезу за остеосинтезу осколкових переломів стегнової кістки у собак із використанням коллапану. *Вісник Білоцерків. нац. аграр. ун-ту*. 2014. Вип. 14 (114). С. 145–150

91. Гайко Г. В. Бруско А. Т. Теоретические аспекты физиологической и репаративной регенерации костей с позиций системных представлений. *Журнал НАМН України*. 2013. № 4. Т. 19. С. 471–481.

92. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants / V. Domazetovic et al. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017. Vol. 14, no 2. P. 209–216. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209

93. Бабак С.В. Изменения в структуре каналов и кровеносных сосудов бедренных костей крыс при снятии опорной нагрузки. *Український морфо-*



логічний альманах. 2010. № 2. Т. 8. С. 5–7.

94. Controversial technologies in intramedullary osteosynthesis of rats femur fractures / A. Mansyrov et al. *ScienceRise: Medical Science*. 2021. No. 2(41). P. 4–9. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-4798.2021.227854>

95. Scott H. Repair of long bone fractures in cats. *In Practice*. 2005. Vol. 27, no 8. P. 390–397.

96. Bone Fracture Acute Phase Response—A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications / C. E. Baker et al. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2018. Vol. 16, no. 4. P. 142–158. URL: <https://doi.org/10.1007/s12018-018-9256-x97> Somaiya R., Kaur G. Future of Bone Repair. *Bone and Tissue Regeneration Insights*. 2015. Вып. 6. С. BTRIS12333.

98 Roberts J. L., Paglia D. N., Drissi H. Transcriptional Mechanisms of Secondary Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*. 2018. Vol. 16, no. 2. P. 146–154. URL: <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0429-9>

99. Rodríguez-Merchán E C. A Review of Recent Developments in the Molecular Mechanisms of Bone Healing. *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol. 22. P. 767. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22020767>

100. Functional Biomaterials for Bone Regeneration: A Lesson in Complex Biology. A. R Armiento et al. *Advanced Functional Materials*. 2020. Vol. 30, no 44. P. 1–41. DOI: 10.1002/adfm.201909874

101. Giannoudis P. V., Capanna R. Tissue engineering and bone regeneration. INC, 2006. 917–936 с.

102. Agarwal A. Nonunions: Diagnosis, Evaluation and Management. Springer New York, NY. 2017. P. 1–346. URL: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7178-7>

103. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering / T. Winkler et al. *Bone & Joint Research*. 2018. Vol. 7, no. 3. P. 232–243. URL: <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.bjr-2017-0270.r1>

104. Francois E. L., Yaszemski M. J. Preclinical Bone Repair Models in Regenerative Medicine. *Principles of Regenerative Medicine*. 2019. P. 761–767. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00043-6>
105. Proposed Mechanism of Action of Topically Applied Autologous Blood Clot Tissue: A Quintessential Cellular and Tissue Based Therapy / R. J. Snyder et al. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2020. Vol. 13. P. 20–140. doi: 10.7547/20-140.
106. Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen / J. Y. Hsieh et al. *Acta Biomaterialia*. 2017. Vol. 47. P. 14–24. URL: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.024>
107. Рубленко М. В., Семеняк С. А., Андрієць В. Г. Молекулярно-біологічні механізми репаративного остеогенезу. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2017. №2 С. 11–20.
108. Osteoimmunology: Interplay Between the Immune System and Bone Metabolism / M. C. Walsh et al. *Annual Review of Immunology*. 2006. Vol. 24, no. 1. P. 33–63. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090646>
109. Zhang T., Yao J Y. Effects of inflammatory cytokines on bone/cartilage repair. *Cell Biochem*. 2018. P.1–10. DOI: 10.1002/jcb.27953
110. Оцінка остеointegraційних і остеоіндуктивних властивостей кераміки, легованої кремнієм, за модельних переломів стегнової кістки у кролів / М. В. Рубленко та ін. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2018. № 2. С. 44 – 53 doi: 10.33245/2310-4902-2018-144-2-44-53
111. Beale B., McCally R. Minimally Invasive Fracture Repair of the Tibia and Fibula. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2020. Vol. 50, no. 1. P. 183–206. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.08.008>
112. Functional relationship between osteogenesis and angiogenesis in tissue regeneration / F. Diomedede et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no 9.
113. The evaluation of a degradable Magnesium alloy Bio-Transfix nail system compounded with bone morphogenetic protein-2 in a beagle anterior cruciate ligament reconstruction model Fu Y. M. et al. *Journal of Biomaterials Applications*.

2019. Vol. 34, № 5. P. 687–698.

114. Sequential dual-drug delivery of BMP-2 and alendronate from hydroxyapatite-collagen scaffolds for enhanced bone regeneration. D. Lee et al. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–10.

115. Effectiveness of Allogeneic Platelet-Rich Fibrin on Second-Intention Wound Healing of Experimental Skin Defect in Distal Limb in Donkeys (*Equus asinus*) / M. A. Hamed et al. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2019. Vol. 73. P. 131–138. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.12.014>

116. From Platelet-Rich Plasma to Advanced Platelet-Rich Fibrin: Biological Achievements and Clinical Advances in Modern Surgery / A. Caruana et al. *European Journal of Dentistry*. 2019. Vol. 13, no. 02. P. 280–286. URL: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696585>

117. Chhabra P., Chhabra P., Sharma K. Platelet rich fibrin – its structural design and composition. *International Journal of Oral Health Dentistry*. 2019. Vol. 5, no. 2. P. 81–84. URL: <https://doi.org/10.18231/j.ijohd.2019.019>

118. Bone morphogenetic proteins: A powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations / A. Oryan et al. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2014. Vol. 40 (5). P. 459-81. DOI: 10,1002 / biof.1177

119. Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria / V. L. Davis et al. *Journal of Oral Implantology*. 2014. Vol. 15. № 4. P. 511 – 521.

120. Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges / Z. Badran et al. *Platelets*. 2017. Vol. 29, no. 2. P. 105–112. URL: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1327656>

121. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system / H. Y. Dar et al. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018. Vol. 1(23). P. 464–492. doi: 10.2741/4600.

122. Danylovyh G. V., Bohach T. V., Danylovyh Y. V. The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role

in mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, no. 1. P. 3–24.

URL: <https://doi.org/10.15407/ubj90.01.003>

123. Functional Interplay Between Angiotensin II and Nitric Oxide / C. Yan et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003. Vol. 23, no. 1. P. 26–36. URL: <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000046231.17365.9d>

124. Nitric oxide and arginase levels in peri-implant tissues after delayed loading / C. Gokmenoglu et al. *Archives of Oral Biology*. 2018. Vol. 85. P. 207–211.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.10.019>

125. Direct conversion of fibroblasts to osteoblasts as a novel strategy for bone regeneration in elderly individuals / Y. Chang et al. *Experimental & Molecular Medicine*. 2019. Vol. 51, no. 5. P. 1–8. URL: [https://doi.org/10.1038/s12276-019-](https://doi.org/10.1038/s12276-019-0251-1)

[0251-1](https://doi.org/10.1038/s12276-019-0251-1)

126. Bayliss L., Mahoney D. J., Monk P. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)*. 2012. Vol. 30, no. 2. P. 47–53. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.12.009>

127. Influence of hormones on osteogenic differentiation processes of mesenchymal stem cells / R. Ebert et al. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*. 2007. Vol. 2, no. 1. P. 59–78.

URL: <https://doi.org/10.1586/17446651.2.1.59>

128. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1–34) / A. Nakajima et al. *J Bone Miner Res*. 2002. Vol. 17. P. 2038–2047.

129. Manolagas S. C., O'Brien C. A., Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013. Vol. 9(12). P. 699–712. DOI:10.1038/nrendo.2013.179

130. Almeida J. M., Bosco A. F., Faleiros P. L. Effects of oestrogen deficiency and 17  $\beta$ -estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft. *Arch Oral Biol*. 2015. Vol. 60 (4). P. 631–641.

131. Клініко-рентгенологічна характеристика експериментального застосування фібринового гелю для оптимізації репаративного остеогенезу в

кролів / М. В Рубленко та ін. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2014. № 14 (114). С. 130–134.

132. Рубленко М. В. Семеняк С. А., Ульянич Н. В. Динаміка біомаркерів репаративного остеогенезу за умов заміщення кісткових дефектів. *Науковий вісник ЛНУВВБТ ім. С.З. Гжицького*. 2014. Т.16, №3 (60), Ч. 1. С. 287–294.

133. The Effects of nano hydroxyapatite and nano hydroxyapatite doped by magnesium on fracture healing in dogs / S.M. Sallam, et al. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2020. Vol. 38, pp. 47-51.

134. Ortved K. F. Regenerative Medicine and Rehabilitation for Tendinous and Ligamentous Injuries in Sport Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2018. Vol. 34, no. 2. P. 359–373.  
URL: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.04.012>

135. The roles of ions on bone regeneration / E. O'Neill et al. *Drug Discovery Today*. 2018. Vol. 23, no. 4. P. 879–890.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.049>

136. Ribitsch I., Oreff G. L., Jenner F. Regenerative Medicine for Equine Musculoskeletal Diseases. *Animals*. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 234.  
URL: <https://doi.org/10.3390/ani11010234>

137. A Comprehensive Review of Stem Cells for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis / G. Kalamegam et al. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham, 2018. P. 23–36. URL: [https://doi.org/10.1007/5584\\_2018\\_205](https://doi.org/10.1007/5584_2018_205)

138. Volk S. W., Theoret C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair and Regeneration*. 2013. Vol. 21, no. 3. P. 382–394. URL: <https://doi.org/10.1111/wrr.12044>

139. KRAUS K. H., KIRKER-HEAD C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Veterinary Surgery*. 2006. Vol. 35, no. 3. P. 232–242.  
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.2006.00142.x>

140. Mesenchymal stem cells and biologic factors leading to bone formation / M. Bartold et al. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019. Vol. 46. P. 12–32.  
URL: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13053>

141. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs / A. Sasaki et al. *World Journal of Stem Cells*. 2019. Vol. 11, no. 5. P. 254–269. URL: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i5.254>

142. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution / D. M. Dohan et al. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006. Vol. 101, no. 3. P. e37-e44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>

143. Influence of Cellular Composition and Exogenous Activation on Growth Factor and Cytokine Concentrations in Canine Platelet-Rich Plasmas / S. P. Franklin et al. *Frontiers in Veterinary Science*. 2017. Vol. 4. URL: <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00040>

144. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro / M. O. Schär et al. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2015. Vol. 473, no. 5. P. 1635–1643. URL: <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4192-2>.

145. Biomechanical evaluation of fixation properties of fibrin glue for ventral incisional hernia repair / N. Stoikes et al. *Hernia*. 2013. Vol. 19, no. 1. P. 161–166. URL: <https://doi.org/10.1007/s10029-013-1163-y>

146. Fibrin glue mesh fixation combined with mesenchymal stem cells or exosomes modulates the inflammatory reaction in a murine model of incisional hernia / Blázquez R et al. *Acta Biomaterialia*. 2018. Vol. 71. P. 318–329.

147. The role of leucocyte- and platelet rich fibrin (L-PRF) in periodontal regeneration: A review article / N. Mhaske et al. *Mouth Teeth*. 2018. Vol. 2. № 3. P. 1–5.

148. Marcazzan S., Weinstein R. L., Fabbro M. D. Efficacy of platelets in bone healing: A systematic review on animal studies. *Platelets, Early Online*. 2017. P. 1 – 12. Available at: <http://www.tandfonline.com/iplt>

149. Ayswaria B., Sarath C., Seema G. An Overview of Platelet Rich Fibrin in Periodontal Therapy. *Journal of Indian Dental Association Attingal Branch*. 2018. Vol. 8. № 2. P. 49 – 53.

150. Tendinopathies and platelet-rich plasma (PRP): from pre-clinical experiments to therapeutic use / J.F Kaux et al. *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine*. 2015. Vol. 11. № 1. P. 7–17.

151. Badis D, Omar B. The effectiveness of platelet-rich plasma on the skin wound healing process: A comparative experimental study in sheep. *Veterinary World*. 2018. Vol. 11. № 6. P. 800–808. doi: 10.14202/vetworld.2018.800-808

152. Demir A, Altundağ Y: Comparison of the efficacy of the nictitating membrane flap, conjunctival pedicle flap, and platelet-rich fibrin membrane graft techniques in the surgical management of corneal necrosis in cats: A retrospective study (2016-2020). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2022. Vol. 28 (1) P. 1–10. DOI: 10.9775/kvfd.2021.26119

153. Evaluation of surgical treatment using PRF membrane in deep corneal ulcers accompanied by a descemetocoele in cats: Retrospective study (2019-2021) / A. Demir et al. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2022. Vol. 28 (2). P. 217–227, DOI: 10.9775/kvfd.2021.26738

154. Bioengineered surgical repair of a chronic oronasal fistula in a cat using autologous platelet-rich fibrin and bone marrow with a tailored 3D printed implant / C. S. Soares et al. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2018. Vol. 20, no. 9. P. 835–843. URL: <https://doi.org/10.1177/1098612x18789549>

155. Effects of platelet-rich plasma and carbonated hydroxyapatite combination on cranial defect Bone Regeneration: An animal study / M.C. Oleya et al. *Wound Medicine*. 2018. № 21. P. 12 – 15.

156. Dohan Ehrenfest David M. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscle, Ligaments and Tendons Journal*. 2014. URL: <https://doi.org/10.11138/mltj/2014.4.1.0013>

157. Chou T. M., Chang H. P., Wang J. C. Autologous platelet concentrates in maxillofacial regenerative therapy. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2020. Vol. 36, no. 5. P. 305–310. Doi: 10.1002/kjm2.12192

158. PRP and Articular Cartilage: A Clinical Update / A. Marmotti et al. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. P. 1–19. URL: <https://doi.org/10.1155/2015/542502>

159. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix / E. Lucarelli et al. *European Cells and Materials*. 2010. Vol. 20. P. 13–23. Doi: 10.22203/eCM.v020a02

160. Khalaf F. H., Salih S. I. Clinical and histopathological evaluation of using platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin matrix in treatment of induced chronic open wounds in bucks. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018. Vol. 11, no. 5. P. 337. URL: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.24105>

161. Muñoz F. T., Haidar Z. S. L-PRF for Use in Oro-Maxillo-Facial Surgeries: What Do We Know? *Journal of Oral Research*. 2018. Vol. 7, no. 3. P. 88–90. URL: <https://doi.org/10.17126/joralres.2018.012>

162. Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP / X. Wang et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, no. 2. P. 331. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms18020331>

163. Influence of Fractionation Methods on Physical and Biological Properties of Injectable Platelet-Rich Fibrin: An Exploratory Study / P. Thanasisuebwong et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, no. 7. P. 1657. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20071657>

164. Choukroun J., Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2017. Vol. 44, no. 1. P. 87–95. URL: <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9>

165. Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering / F. Raquel Maia et al. *Principles of Regenerative Medicine*. 2019. P. 535–558. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00032-1>



166. Platelet rich fibrin: focus on growth factors and cytokines / A. Mali et al. *International Journal of Recent Scientific Research*. 2018. Vol. 9. no 5 (B). P. 26531 – 26535. URL: <http://dx.doi.org/10.24327/ijrsr.2018.0905.2078>
167. Crisci A., Crescenzo U. D., Crisci M. Platelet-rich concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: Control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Journal of Clinical and Molecular Medicine*. 2018. Vol. 1, no. 3. URL: <https://doi.org/10.15761/jcmm.1000116>
168. Thon J. N., Italiano J. E. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. *Antiplatelet Agents*. Berlin, Heidelberg, 2012. P. 3–22. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_1)
169. Irmak G., Demirtaş T. T., Gümüşderelioglu M. Sustained release of growth factors from photoactivated platelet rich plasma (PRP). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020. Vol. 148. P. 67–76. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.011>
170. Klinger M. H. F., Jelkmann W. Review: Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2002. Vol. 22, no. 9. P. 913–922. URL: <https://doi.org/10.1089/10799900260286623>.
171. Generation of reactive oxygen species in blood platelets / B. Wachowicz et al. *Platelets*. 2002. Vol. 13, no. 3. P. 175–182. URL: <https://doi.org/10.1080/09533710022149395> .
172. Platelet-Derived Products in Veterinary Medicine: A New Trend or an Effective Therapy? / C. S. Soares et al. *Trends in Biotechnology*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.07.011>
173. Industrial-scale processing of activated platelet-rich plasma from specific pathogen-free pigs and its effect on promoting human hair follicle dermal papilla cell cultivation / Y.-K. Lin et al. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2017. Vol. 71. P. 28–37. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.12.016> .
174. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix / E. Lucarelli et al. *European Cells and Materials*. 2010. Vol. 20. P. 13–23.

URL: <https://doi.org/10.22203/ecm.v020a02>

175. Platelet Aggregation Percentage Increased in Healthy Broodmares During the Peripartum / M. Bazzano et al. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015. Vol. 35, no. 7. P. 573–576. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.03.193>

176. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study / Y. Zhang et al. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012. Vol. 40, no. 4. P. 321–328. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2011.04.020>.

177. Yelamali T., Saikrishna D. Role of Platelet Rich Fibrin and Platelet Rich Plasma in Wound Healing of Extracted Third Molar Sockets: A Comparative Study. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*. 2014. Vol. 14, no. 2. P. 410–416. URL: <https://doi.org/10.1007/s12663-014-0638-4>.

178. Регенеративні реакції при заповненні кісткових дефектів біосклом у поєднанні з аутологічною тромбоцитарною плазмою. *ТРАВМА* / О. Бур'янов. *ТРАВМА*. 2019. Вип. 20, № 1. С. 56–61. URL: <https://doi.org/10.22141/1608-1706.1.20.2019.158670>

179. Debnath K., Chatterjee A. Comparative evaluation of growth factors from platelet concentrates: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2019. Vol. 23, no. 4. P. 322. URL: [https://doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_678\\_18](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_678_18)

180. Platelet-rich fibrin or platelet-rich plasma – which one is better? an opinion / S. Bansal et al. *Indian Journal of Dental Sciences*. 2017. Vol. 9, no. 5. P. 49. URL: [https://doi.org/10.4103/ijds.ijds\\_55\\_17](https://doi.org/10.4103/ijds.ijds_55_17)

181. Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update / M. R. De Pascale et al. *Transfusion Medicine Reviews*. 2015. Vol. 29, no. 1. P. 52–61. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.11.001>

182. Peck M.T, Hiss D., Stephen L. Factors affecting the preparation, constituents, and clinical efficacy of leukocyte- and platelet- rich fibrin (L-PRF). *South African Dental Journal*. 2016. Vol. 71, no. 7. P. 298 – 302.

183. Arora S., Agnihotri N. Platelet Derived Biomaterials for Therapeutic Use: Review of Technical Aspects. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2016. Vol. 33, no. 2. P. 159–167. URL: <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0669-8>
- 184 Steller D, Herbst N, Pries R, Juhl D, Hakim SG, Impact of incubation method on the release of growth factors in Non-Ca<sup>2+</sup>-activated PRP, Ca<sup>2+</sup>-activated PRP, PRF and A-PRF. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2018. P. 1–28. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.10.017>
185. Comparative impact of platelet rich plasma and transforming growth factor- $\beta$  on chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells / R. Hesari та ін. *BioImpacts*. 2019. Т. 10, № 1. С. 37–43. URL: <https://doi.org/10.15171/bi.2020.05>
186. Fibrin Matrices as (Injectable) Biomaterials: Formation, Clinical Use, and Molecular Engineering / I. V. Roberts et al. *Macromolecular Bioscience*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 1900283. URL: <https://doi.org/10.1002/mabi.201900283>
187. Sam G., Vadakkekuttical R., Amol N. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2015. Vol. 19, no. 1. P. 32–36. URL: <https://doi.org/10.4103/0972-124x.145821>
188. Age-Related Regeneration of Osteochondral and Tibial Defects by a Fibrin-Based Construct in vivo / X. Feng et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00404>
189. Platelet-Rich Plasma Therapy in the Treatment of Diseases Associated with Orthopedic Injuries / J. Fang et al. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2020. P. 571–585. URL: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0292>
190. The Effect of Platelet-Rich Fibrin, Calcium Sulfate Hemihydrate, Platelet-Rich Plasma and Resorbable Collagen on Soft Tissue Closure of Extraction Sites / L. Yerke et al. *Journal of Functional Biomaterials*. 2017. Vol. 8, no. 2. P. 17. URL: <https://doi.org/10.3390/jfb8020017>.

191. Effects of Polylactide Copolymer Implants and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration within a Large Calvarial Defect in Sheep / B. Błaszczuk et al. *BioMed Research International*. 2018. Vol. 2018. P. 1–11. URL: <https://doi.org/10.1155/2018/4120471>

192. Role of Platelet-Rich Plasma in Acceleration of Bone Fracture Healing / R. Simman et al. *Annals of Plastic Surgery*. 2008. Vol. 61, no. 3. P. 337–344. URL: <https://doi.org/10.1097/sap.0b013e318157a185>.

193. Сулаева О. Н. Сравнительная характеристика пробирок для получения богатой тромбоцитами плазмы. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. Вип. 3 (5). С. 135-139. URL: <https://doi.org/10.26693/jmbs02.03.135>

194. In Situ Casting of Platelet Rich Plasma/SiO<sub>2</sub>/Alginate for Bone Tissue Engineering Application in Rabbit Mandible Defect Model / A. Gholijani et al. *Journal of Dentistry (Shiraz)*. 2022. Vol. 23. P. 349–360. DOI: 10.30476/DENTJODS.2021.90677.1513.

195 Combined plasma rich in growth factors and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the cutaneous wound healing in rabbits / D. Chicharro et al. *BMC Veterinary Research*. 2018. Vol. 14, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1577-y>.

196. Harsini M. S., Oryan A. Growth Factor of Platelet-Rich Plasma and its Application in Trauma and Orthopedic Surgery. *EC Orthopaedics*. 2018. Vol. 9. P. 139–146.

197. Chitosan inhibits platelet-mediated clot retraction, increases platelet-derived growth factor release, and increases residence time and bioactivity of platelet-rich plasma in vivo / G. Deprés-Tremblay et al. *Biomedical Materials*. 2017. Vol. 13, no. 1. P. 015005. URL: <https://doi.org/10.1088/1748-605x/aa8469>

198. Platelet-Rich Plasma / T. E. Foster et al. *The American Journal of Sports Medicine*. 2009. Vol. 37, no. 11. P. 2259–2272. URL: <https://doi.org/10.1177/0363546509349921>.

199. Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation / M. Fujioka-Kobayashi et al. *Platelets*. 2020. P. 1–7. URL: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1754382> .

200. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate / M. Tunali et al. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013. Vol. 51, no. 5. P. 438–443. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.08.003>

201. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use / M. Kobayashi et al. *Biologicals*. 2012. Vol. 40, no. 5. P. 323–329. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.004>.

202. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor release and contradictory results / D. M. Dohan Ehrenfest et al. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2010. Vol. 110, no. 4. P. 418–421. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.05.059>

203. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization / H. A. Varela et al. *Clinical Oral Investigations*. 2018. Vol. 23, no. 3. P. 1309–1318. URL: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2555-2>

204. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF) / H. Masuki et al. *International Journal of Implant Dentistry*. 2016. Vol. 2, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4>

205. Donos N., Dereka X., Calciolari E. The use of bioactive factors to enhance bone regeneration: A narrative review. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019. Vol. 46. P. 124–161. URL: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13048> .

206. Polak D., Clemer-Shamai N., Shapira L. Incorporating antibiotics into platelet-rich fibrin: A novel antibiotics slow-release biological device. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019. Vol. 46, no. 2. P. 241–247. URL: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13063>

207. A proof of the low speed centrifugation concept in Rodents: New perspectives for in vivo research. / S. Ghanaati et al. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2018. Vol. 24, no. 11. P. 659–670.

URL: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0236>

208. Kececi Y., Ozsu S., Bilgir O. A Cost-Effective Method for Obtaining Standard Platelet-Rich Plasma. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. 2014. Vol. 26, no. 8. P. 207–213.

209. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept) / K. El Bagdadi et al. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2017. Vol. 45, no. 3. P. 467–479.

URL: <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0785-7>

210. Chen T.-Y. Wound Management with and without Modified Choukroun's Platelet-Rich Fibrin in Rescued Formosan Pangolins (Manis Pentadactyla Pentadactyla). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2021. Vol. 52, no. 2.

URL: <https://doi.org/10.1638/2017-0252>

211. Canine-Origin Platelet-Rich Fibrin as an Effective Biomaterial for Wound Healing in Domestic Cats: A Preliminary Study / C. S. Soares et al. *Veterinary Sciences*. 2021. Vol. 8, no. 10. P. 213.

URL: <https://doi.org/10.3390/vetsci8100213>

212. Use of Autologous Leucocyte- and Platelet-Rich Plasma (L-PRP) in the Treatment of Aural Hematoma in Dogs / R. Perego et al. *Veterinary Sciences*. 2021. Vol. 8, no. 9. P. 172.

URL: <https://doi.org/10.3390/vetsci8090172>

213. Antimicrobial action of autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs / H. A. Farghali et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48657-5>

214. Kossev P., Sokolov T. Platelet-rich Plasma (PRP) in Orthopedics and Traumatology – Review. *Immunopathology and Immunomodulation*. 2015. P. 173 –

195. URL: <https://doi.org/10.5772/61326>

215. Effectiveness of Silicon Platelet-Rich Fibrin and Autologous Bone on Bone Regeneration in Rabbit Calvarian Defects: A Radiological and Histological Study / A. Hernández-Suarez et al. *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, no. 9. P. 4074. URL: <https://doi.org/10.3390/app11094074>

216. El-dien A. M. S., Fathy S., El-din Y. A. Potential Bone Regenerative Effects of DFDBA, Simvastatin and Platelet Rich Fibrin, Radiographically and Histologically of Intra-Bony Periodontal Defects in White New Zealand Rabbits. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2021. Vol. 9, no. D. P. 72–80. URL: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.5848>

217. Bone Regeneration in Peri-Implant Defect Using Autogenous Tooth Biomaterial Enriched with Platelet-Rich Fibrin in Animal Model / M. Hwan Jung et al. *Applied Sciences*. 2020. Vol. 10, no. 6. P. 1939. URL: <https://doi.org/10.3390/app10061939>

218. Use of Platelet-Rich Fibrin Associated with Xenograft in Critical Bone Defects: Histomorphometric Study in Rabbits / P. W. Maia et al. *Symmetry*. 2019. Vol. 11, no. 10. P. 1293. URL: <https://doi.org/10.3390/sym11101293>

219. The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: micro-CT and biomarker results / F. Faot et al. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/srep46452>

220. Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma / M. Abd El Raouf et al. *Platelets*. 2017. Vol. 30, no. 2. P. 213–221. URL: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1401058>

221. A Novel Technique for Conjunctivoplasty in a Rabbit Model: Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting / M. E. Can et al. *Journal of Ophthalmology*. 2016. Vol. 2016. P. 1–11. URL: <https://doi.org/10.1155/2016/1965720>

222 The Effect of Platelet Rich Fibrin on Angiogenesis During Periodontal Regeneration / M. A. Samuel et al. *Alexandria Dental Journal*. 2017. Vol. 42, no. 2. P. 182–186. URL: <https://doi.org/10.21608/adjalexu.2017.57924>

223. Chung C.-S., Wei Y.-F., Lin L.-S. Submucosal Injection of Activated Platelet-Rich Plasma for Treatment of Periodontal Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*. 2022. P. 089875642211241. URL: <https://doi.org/10.1177/08987564221124165>

224. Evaluation of the regenerative potential of dentin conditioning and naturally derived scaffold for necrotic immature permanent teeth in a dog model / H. M. El Halaby et al. *International Journal of Experimental Pathology*. 2020. Vol. 101, no. 6. P. 264–276. URL: <https://doi.org/10.1111/iep.12372>

225. Assessment of the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Traumatic Canine Fractures / S. López et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, no. 5. P. 1075. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20051075>

226. Hussein S. Effects of autologous platelet-rich plasma on skin healing in dogs. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 32, no. 2. P. 275–283. URL: <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.153864>

227. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs / H. A. Farghali et al. *Bioscience Reports*. 2017. Vol. 37, no. 2. URL: <https://doi.org/10.1042/bsr20160503>

228. Autologous Platelet-Rich Plasma Enhances the Healing of Large Cutaneous Wounds in Dogs / I. Iacopetti et al. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575449>

229. Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin / D. Kazemi et al. *Bone & Joint Research*. 2017. Vol. 6, no. 2. P. 98–107. URL: <https://doi.org/10.1302/2046-3758.62.bjr-2016-0188.r1>

230. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs / J. M. Vilar et al. *BMC Veterinary Research*. 2013. Vol. 9, no. 1. P. 131. URL: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-131>

231. Raffea N. M., Allawi A. H. Effect of autologous peritoneum and platelet-rich fibrin graft on healing of intestinal anastomosis in dogs. *Iraqi Journal of*



*Veterinary Sciences*. 2022. Vol. 36, no. 2. P. 459–470.

URL: <https://doi.org/10.33899/ijvs.2021.130529.1840>

232. Effect of Autologous Plasma Treatment on the Cornea Regeneration with Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs / Y. A. Vatnikov et al. *Journal of Animal Health and Production*. 2020. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2020/8.1.1.7>

233. Evaluation of the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane to enhance tendon healing in dogs / L. C. Visser et al. *American Journal of Veterinary Research*. 2011. Vol. 72, no. 5. P. 699–705. URL: <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.5.699>

234. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats / J.-F. Kaux et al. *Wound Repair and Regeneration*. 2012. Vol. 20, no. 5. P. 748–756. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2012.00826.x>

235. Yousefi A. R., Kazemi D., Rezaei M. Effect of Platelet-Rich Fibrin on Biomechanical and Biochemical Aspects Of Tendon Healing: A Preliminary Animal Study. *Journal of Musculoskeletal Research*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1142/s0218957722500166>

236. Bone formation with functionalized 3D printed poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffold with plasma-rich-fibrin implanted in critical-sized calvaria defect of rat / M.-C. Chen та ін. *Journal of Dental Sciences*. 2021. Vol. 16, no 4. P. 1214–1221. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.01.015>

237. Early therapeutic effect of platelet-rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical-sized mandibular defects / M. A. Awadeen et al. *World Journal of Stem Cells*. 2020. Vol. 12, no. 1. P. 55–69. URL: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i1.55>

238. Mah J. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *The European Journal of Orthodontics*. 2004. Vol. 26, no. 5. P. 475–482. URL: <https://doi.org/10.1093/ejo/26.5.475>

239. Abdullah W. A. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate

bone graft material. *The Saudi Dental Journal*. 2016. Vol. 28, no. 3. P. 109–117. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2015.09.003>

240. Encapsulation of lyophilized platelet-rich fibrin in alginate-hyaluronic acid hydrogel as a novel vascularized substitution for myocardial infarction / B. Qian et al. *Bioactive Materials*. 2022. Vol. 7. P. 401–411. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.042>

241. The effect of platelet-rich plasma in inactive form on the burn zone of stasis in rats / E. Orhan et al. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*. 2019. Vol. 53, no. 5. P. 301–308. URL: <https://doi.org/10.1080/2000656x.2019.1614454>

242. Sinan A., Eesa M. J. Omar R. A. Radiological study of the influence of platelet rich-plasma and low level laser therapy on healing of experimentally fractured proximal sesamoid bone in equine: Part II. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2017. Vol. 5, no. 5. P. 737–741.

243. Marcatili M., Marshall J., Voute L. Magnetic resonance imaging-guided injection of platelet-rich plasma for treatment of an insertional core lesion of the deep digital flexor tendon within the foot of a horse. *Equine Veterinary Education*. 2016. Vol. 30, no. 8. P. 409–414. URL: <https://doi.org/10.1111/eve.12697>

244. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino / A. L. M. Yamada et al. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016. Vol. 36, no. 6. P. 461–467. URL: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016000600001>

245. Addition of Mesenchymal Stem Cells to Autologous Platelet-Enhanced Fibrin Scaffolds in Chondral Defects / L. R. Goodrich et al. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2016. Vol. 98, no. 1. P. 23–34. URL: <https://doi.org/10.2106/jbjs.o.00407>

246. Effects of Platelet-Rich Fibrin on Hard Tissue Healing: A Histomorphometric Crossover Trial in Sheep / E. Ondur et al. *Materials*. 2020. Vol. 13, no. 7. P. 1695. URL: <https://doi.org/10.3390/ma13071695>

247. A mini-pig model for evaluating the efficacy of autologous platelet patches on induced acute full thickness wound healing / H.-C. Tsai et al. *BMC*

*Veterinary Research*. 2019. Vol. 15, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1932-7>

248. Histologic changes in early colonic anastomotic healing using autologous platelet-rich fibrin matrix / B. Dauser et al. *European Surgery*. 2019. Vol. 52, no. 4. P. 155–164. URL: <https://doi.org/10.1007/s10353-019-0578-9>

249. Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma - PRP, or Platelet-Rich Fibrin - PRF): the international classification of the POSEIDO / Dohan Ehrenfest D. M. et al. *POSEIDO*. 2013. Vol. 1. no 1. P. 17 – 27.

250. Regulation of immune response by bioactive ions released from silicate bioceramics for bone regeneration / Y. Huang et al. *Acta Biomaterialia*. 2018. Vol. 66. P. 81–92. URL: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.044>

251. Gait Changes Vary among Horses with Naturally Occurring Osteoarthritis Following Intra-articular Administration of Autologous Platelet-Rich Plasma / M. H. Mirza et al. *Frontiers in Veterinary Science*. 2016. Vol. 3. URL: <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00029>

252. Івченко Д. В., Мирошніков В. В. Оптимізація кісткової регенерації у пацієнтів з остеопоротичними компресійними переломами тіл грудних і поперекових хребців. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Вип. 3, № 1. С. 123–129. URL: <https://doi.org/10.26693/jmbs03.01.123>

253 Effectiveness of platelet-rich fibrin matrix treated with silver nanoparticles in fracture healing in rabbit model / S. I. Salih et al. *Veterinary World*. 2018. Vol. 11, no. 7. P. 944–952. URL: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.944-952>.

254. Влияние биокомпозитного материала на процессы регенерации костной ткани в условиях эксперимента иммуногистохимическое исследование / Науменко Л. Ю и др. *Травма*. 2014. Том 15. № 4. С. 66–72.

255. Di Bella C., Farlie P., Penington A. J. Bone Regeneration in a Rabbit Critical-Sized Skull Defect Using Autologous Adipose-Derived Cells. *Tissue*

*Engineering Part A.* 2008. Vol. 14, no. 4. P. 483–490.

URL: <https://doi.org/10.1089/tea.2007.0137>

256. Examination of  $\beta$ -TCP/collagen composite in bone defects without periosteum in dogs: a histological and cast model evaluation / S. Hojo та ін. *Odontology*. 2020. Т. 108, № 4. С. 578–587.

URL: <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00506-y>.

257. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery / A. Simonpieri et al. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012. Vol. 13, no. 7. P. 1231–1256.

URL: <https://doi.org/10.2174/138920112800624472>

258. Histological Preparation Technique of Blood Derivative Injectable Platelet-Rich Fibrin (I-Prf) for Microscopic Analyzes / H. d. A. Varela et al. *Journal of Cytology & Histology*. 2018. Vol. 09, no. 03. URL: <https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000506>

259. A Proof of the Low Speed Centrifugation Concept in Rodents: New Perspectives for In Vivo Research / S. Ghanaati et al. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2018. Vol. 24, no. 11. P. 659–670.

URL: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0236>.

260. Experimental substantiation of the use of hydroxyapatite - Tricalcium phosphate bioceramics for replacing bone defects after tumor removal / V. F. Konovalenko et al. *Experimental Oncology*. 2021. Vol. 43, no 3. P. 237–241.

261. Grand F., Guitton J., Goudable J. Optimization of the measurement of nitrite and nitrate in serum by the Griess reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2001. Vol. 59. P. 559–565.

262. Реакція гострої фази та рівень оксиду азоту в крові корів за субклінічного маститу / Єрошенко О.В. та ін. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2015. Вип 1. С. 5–9.

263. Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays / A. Bernhardt et al. *European Cells and Materials*. 2017. Vol. 33.

P. 28–42. URL: <https://doi.org/10.22203/ecm.v033a03>.

264. Janckila A. J., Yam L. T. Biology and Clinical Significance of Tartrate-Resistant Acid Phosphatases: New Perspectives on an Old Enzyme. *Calcified Tissue International*. 2009. Vol. 85, no. 6. P. 465–483.

URL: <https://doi.org/10.1007/s00223-009-9309-8>

265. Показники клітинного метаболізму в сироватці крові коней за латентного перебігу лептоспірозу та ринопневмонії / О.Є. Галатюк та ін. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького*, 2017. т 19, № 78. doi:10.15421/nvlvet7804

266. High levels of latent antithrombin in plasma from patients with antithrombin deficiency / M. de la Morena-Barrio et al. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017. Vol. 117, no. 05. P. 880–888.

URL: <https://doi.org/10.1160/th16-11-0866>

267 Corral J., de la Morena-Barrio M. E., Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thrombosis Research*. 2018. Vol. 169. P. 23–29.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.008>

268. Effect of age, sex, and body size on the blood biochemistry and physiological constants of dogs from 4 wk. to > 52 wk. of age / A. L. Montoya Navarrete et al. *BMC Veterinary Research*. 2021. Vol. 17, no. 1.

URL: <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02976-w>

269. Ефективність застосування різних комбінацій кальцію, вітаміну d та осейн-гідроксиапатитних сполук для покращання остеорепарації та профілактики посттравматичної остеопенії / В.М. Шимон та ін. Від науки до практики. 2016. Т 19. № 1, С. 47–50

270. Веремеенко К. Н, Голобородько О.П., Кизим О.И. Протеолиз в норме и при патологии. Київ: Здоров'я, 1988. 200 с

271. Vagner V. K., Putilin V. M., Harabuga G. G. Methods and results of the study (intestinal and hepatic fraction) of serum alkaline phosphatase in acute surgical diseases of the abdominal organs. *Issues of medicinal chemistry*. 1981. Vol. 27(6). P. 752–755.

272. Determination of soluble fibrin in blood plasma / Vareckaya T. V. et al. *Clinical laboratory diagnostics*. 1992. P. 10–14.
273. Autologous platelet rich plasma for regeneration of tendon injuries in horses / S. T. Roshini et al. *Indian Journal of Animal Research*. 2019. Of. URL: <https://doi.org/10.18805/ijar.b-3653>
274. Does centrifugation matter? Centrifugal force and spinning time alter the plasma metabolome / D. Lesche et al. *Metabolomics*. 2016. Vol. 12, no. 10. URL: <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1109-3>.
275. An introduction to bone tissue engineering / Ž. Perić Kačarević et al. *The International Journal of Artificial Organs*. 2019. Vol. 43, no. 2. P. 69–86. URL: <https://doi.org/10.1177/0391398819876286>
276. John A. E., White N. J. Platelets and Fibrinogen: Emerging Complexity in Trauma-Induced Coagulopathy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2020. Vol. 46, no. 2. P. 125–133.
277. Medcalf R. L., Keragala C. B., Draxler D. F. Fibrinolysis and the Immune Response in Trauma. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2020. Vol. 46, no. 02. P. 176–182. URL: <https://doi.org/10.1055/s-0040-1702170>
278. Чемеровський В. О. Рентгенографічна, макроморфологічна і гематологічна оцінка гідроксиапатитної кераміки з різними фізико-хімічними властивостями. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2020. № 1. С. 140–152. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-140-152>
279. Годосюк Т. П., Рубленко М. В., Власенко В. М. Динаміка гематологічних показників у кролів при остеозаміщенні гідроксиапатитовою керамікою з додаванням германію та в комплексі з активатором згортання крові. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2021. т 23, № 102 С. 78–86. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10212>
280. Регенерація скелету. Роль системи крові і окремих факторів в її перебігу / В.С. Пикалюк, С.А. Кутя, С.О. Мостовий та ін. за ред. В.С. Пикалюка: – Сімферополь: ВД. «Аріол», 2011. 248 с.

281 A mechanosensitive lipolytic factor in the bone marrow promotes osteogenesis and lymphopoiesis / H. Peng et al. *Cell Metabolism*. 2022. Vol. 34. no. 8. P. 1168–1182. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.05.009>

282 Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation / M. Mezger et al. *Frontiers in Immunology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01731>

283. Davidson S. J. Inflammation and Acute Phase Proteins in Haemostasis. *Acute Phase Proteins*. 2013. P.31–54. URL: <https://doi.org/10.5772/55998>

284. Рубленко М. В., Власенко В. М., Семеняк С. А. Кістковий метаболізм у собак за ускладненого перебігу репаративного остеогенезу та заміщення кісткових дефектів остеотропними матеріалами. *Український часопис ветеринарних наук*. 2016. Вип. 237. С. 265–275.

285. Пустовіт Р. В., Рубленко М. В. Уміст кальцію, фосфору та активність кісткової лужної фосфатази в сироватці крові собак за переломів кісток і застосування імуностимуляторів. *Науковий вісник ветеринарної медицини БНАУ*. 2010. Вип. 4. № 76. С. 89–93.

286. Paskalev M., Krastev S., Filipov j. Changes in some serum bone markers after experimental fracture and intramedullary osteosynthesis in dogs. *Trakia journal of sciences*. 2005. Vol. 3. P. 46–50.

287. Рябенко Т.В. Сучасні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини та аналіз показників кісткового метаболізму. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Вип. 5, № 3. С. 89–97. URL: <https://doi.org/10.26693/jmbs05.03.089>

288. Рубленко М. В., Семеняк С. А. Реакція системи крові на кісткову травму в собак залежно від її типу та за ускладнень репаративного остеогенезу. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2015. Вип. 2. С.128–132

289. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs / A. Komnenou et al. *Veterinary Clinical Pathology*. 2005. Vol. 34, no. 1. P. 35–38. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00006.x>

290. Prajapati K. D., Sharma S. S., Roy N. Current perspectives on potential role of albumin in neuroprotection. *Reviews in the Neurosciences*. 2011. Vol. 22, no. 3. URL: <https://doi.org/10.1515/rns.2011.028>

291. Динаміка біохімічних кісткових і ендотеліальних показників за заміщення кісткових дефектів у собак гідроксиапатитною керамікою, легованою кремнієм / М. В. Рубленко та ін. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2021. № 1. С. 191–200. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-165-1-191-200>

292. Пустовіт Р. В. Гемостаз та його корекція при переломах трубчастих кісток у собак: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: 16.00.05. Біла Церква, 2008. 22 с.

293. Єрошенко О. В. Білки гострої фази і маркери сполучної тканини за репаративного остеогенезу та його фармакологічна корекція в собак: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія”. Біла Церква, 2013. 20 с.

294. Effects of acetylsalicylic acid on coagulation tests and haptoglobin concentrations in rabbits with permanent transvenous pacing / I. Uhríkova et al. *Veterinární Medicína*. 2016. Vol. 61, No. 9. P. 528–532. URL: <https://doi.org/10.17221/22/2016-vetmed>

295. Haptoglobin Acts as a TLR4 Ligand to Suppress Osteoclastogenesis via the TLR4–IFN- $\beta$  Axis / J.-O. Kwon та ін. *The Journal of Immunology*. 2019. T. 202, № 12. С. 3359–3369. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800661>

296. Proinflammatory and Anabolic Gene Expression Effects of Platelet-Rich Gel Supernatants on Equine Synovial Membrane Explants Challenged with Lipopolysaccharide / J. U. Carmona et al. *Veterinary Medicine International*. 2017. Vol. 2017. P. 1–9. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/6059485>

297. Type-I collagen produced by distinct fibroblast lineages reveals specific function during embryogenesis and Osteogenesis Imperfecta / Y. Chen et al. *Nature Communications*. 2021. Vol. 12, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27563-3>.



298. Superoxide-induced Type I collagen secretion depends on prolyl 4-hydroxylases / R. Shi et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020. Vol. 529, no. 4. P. 1011–1017. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.002>.

299. Machlus K. R., Italiano J. E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 201, no. 6. P. 785–796. URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.201304054>

300. Muench M. O., Bárcena A. Megakaryocyte Growth and Development Factor Is a Potent Growth Factor for Primitive Hematopoietic Progenitors in the Human Fetus. *Pediatric Research*. 2004. Vol. 55, no. 6. P. 1050–1056. URL: <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000127020.00090.51>

301. Symptomatic bone marrow lesions induced by reduced bone mineral density in middle-aged women: a cross-sectional Japanese population study / S. Ota et al. *Arthritis Research & Therapy*. 2019. Vol. 21, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1900-4>

302. Кузняк Н. Б., Бойцанюк С. І., Суховолець І. О. Використання біохімічних маркерів кісткового метаболізму в стоматології. *Клінічна стоматологія*. 2015. Вип. № 1. С. 99–104

303. Evaluation of haemato-biochemical parameters for assessment of fracture healing in dogs / G. A. K. Reddy et al. *The Pharma Innovation*. 2020. Vol. 9, no. 9S. P. 123–125. URL: <https://doi.org/10.22271/tpi.2020.v9.i9sc.5187>

304. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I et al. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2006. Vol. 11, no. 1. P. 32–36.

305. Serum concentrations of canine pancreatic lipase immunoreactivity and C-reactive protein for monitoring disease progression in dogs with acute pancreatitis / K. M. Keany et al. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2021. Vol. 35, no. 5. P. 2187–2195. URL: <https://doi.org/10.1111/jvim.16218>.

306. The effect of age and sex on selected hematologic and serum biochemical analytes in 4,804 elite endurance-trained sled dogs participating in the Iditarod Trail

Sled Dog Race pre-race examination program / S. L. Connolly et al. *PLOS ONE*. 2020. Vol. 15, no. 8. P. e0237706.

URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237706>

307. Malnutrition and Fracture Healing: Are Specific Deficiencies in Amino Acids Important in Nonunion Development? / D. Meesters et al. *Nutrients*. 2018. Vol. 10, no. 11. P. 1597. URL: <https://doi.org/10.3390/nu10111597>.

308. Рубленко М.В. Білий Д.Д. Рівень тромбінемії у собак за електрокоагуляційної екстирпації пухлин молочної залози та залежно від способу фармакологічної корекції гемостазу. *Наук.вісник вет. медицини: зб-к наук. праць*. Біла Церква: БНАУ, 2014. Вип. 14(114). С. 135–138.

309. Davenport R. Pathogenesis of acute traumatic coagulopathy. *Transfusion*. 2013. Vol. 53. P. 23S–27S. URL: <https://doi.org/10.1111/trf.12032>

310. Evaluation of acute traumatic coagulopathy in dogs and cats following blunt force trauma / D. L. Gottlieb et al. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2016. Vol. 27, no. 1. P. 35–43. URL: <https://doi.org/10.1111/vec.12525>

311. Desai U. R. New antithrombin-based anticoagulants. *Medicinal Research Reviews*. 2003. Vol. 24, no. 2. P. 151–181. URL: <https://doi.org/10.1002/med.10058>

312. Huntington J. A. Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011. Vol. 9. P. 26–34. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x>

313. Vandooren J., Itoh Y. Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections. *Frontiers in Immunology*. 2021. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803244>

314. Alpha-2-Macroglobulin Is Acutely Sensitive to Freezing and Lyophilization: Implications for Structural and Functional Studies / A. R. Wyatt et al. *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 6. P. e0130036. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130036>

315. Єрошенко О.В. Реакція гострої фази у собак із переломами кісток передпліччя. *Біологія тварин*. 2012. Том 14. № 1-2. С. 387–393.
316. Distribution and classification of canine long bone fractures / M. Raghunath et al. *The Indian veterinary journal*. 2007. Vol. 84. P. 1243–1246.
317. Bishnoi A. K., Raghunath M., Saii N. S. Classification and characterization of comminuted long bone fractures in dogs. *Veterinary Practitioner* 2013. Vol. 14. no.1. P. 186–189 ref.22
318. A placebo-controlled study comparing the efficacy of intra-articular injections of hyaluronic acid and a novel hyaluronic acid-platelet-rich plasma conjugate in a canine model of osteoarthritis / M.-I. Lee et al. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2019. Vol. 14, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1352-1>
319. Use of a platelet-rich plasma-collagen scaffold as a bioenhanced repair treatment for management of partial cruciate ligament rupture in dogs / S. J. Sample et al. *PLOS ONE*. 2018. Vol. 13, no. 6. P. e0197204. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197204>
320. Schulz K. S., Ash K. J., Cook J. L. Clinical outcomes after common calcanean tendon rupture repair in dogs with a loop-suture tenorrhaphy technique and autogenous leukoreduced platelet-rich plasma. *Veterinary Surgery*. 2019. Vol. 48, no. 7. P. 1262–1270. URL: <https://doi.org/10.1111/vsu.13208>.
321. Application of platelet-rich plasma for canine osteoarthritis treatment - a clinical series / K. B. Aminkov et al. *BULGARIAN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE*. 2021. Vol. 24, no. 4. P. 601–607. URL: <https://doi.org/10.15547/bjvm.2019-0095>.
322. Efficacy of Homologous, Platelet-rich Plasma Dressing in Chronic Non-healing Ulcers: An Observational Study / R. Prabhu et al. *Cureus*. 2018. URL: <https://doi.org/10.7759/cureus.2145>.
323. Efficacy of autologous platelet-rich plasma for the treatment of muscle rupture with haematoma: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-

controlled clinical trial / M. J. Martinez-Zapata et al. *Blood Transfus.* 2016. Vol. 14, no. 2. P. 245–254. doi: 10.2450/2015.0099-15.

324. Kim J.-H., Park C., Park H.-M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Veterinary Dermatology.* 2009. Vol. 20, no. 2. P. 123–126. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00711.x>

325. Topical allogeneic platelet-rich plasma treatment for a massive cutaneous lesion induced by disseminated intravascular coagulation in a toy breed dog / T.-h. Chung et al. *Irish Veterinary Journal.* 2015. Vol. 68, no. 1. P. 4. URL: <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0032-7>.

326. Regenerative therapy for the management of a large skin wound in a dog / E. Zubin et al. *Clinical Case Reports.* 2015. Vol. 3, no. 7. P. 598–603. URL: <https://doi.org/10.1002/ccr3.253>

327. Platelet-rich plasma to treat experimentally-induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis / A. M. Tambella et al. *PLOS ONE.* 2018. Vol. 13, no. 1. P. e0191093. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191093>.

328. Mehrjerdi H. K. Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) Activated By Thromboplastin-D on the Repair and Regeneration of Wounds in Dogs. *Iran. J. Vet. Surg.* 2008. Vol. 3. P. 19–30.

329. Effect of locally injected autologous platelet-rich plasma on second intention wound healing of acute full-thickness skin defects in dogs / D. Psalla et al. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology.* 2015. Vol. 28, no. 03. P. 172–178. URL: <https://doi.org/10.3415/vcot-14-06-0088>

330. Platelet-rich plasma loaded nerve guidance conduit as implantable biocompatible materials for recurrent laryngeal nerve regeneration / J. W. Kim et al. *npj Regenerative Medicine.* 2022. Vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00239-2>

331. Alsousou J., Harrison P. Therapeutic Platelet-Rich Plasma in Wound

Healing. *Platelets*. 2019. P. 1161–1171. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813456-6.00065-5>

332. Co-treatment of wounds in rabbit skin with equine platelet-rich plasma and a commercial ointment accelerates healing / R. S. d. Rezende et al. *Ciência Animal Brasileira*. 2020. Vol. 21. URL: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-56274>

333. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces / R. J. Miron et al. *Clinical Oral Investigations*. 2019. Vol. 24, no. 3. P. 1171–1182. URL: <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02981-2>

334. Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*. 2018. Vol. 29, no. 6. P. 556–568. URL: <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1430357>

335. Wang W., Yeung K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2017. Vol. 2, no. 4. P. 224–247. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>

336. Li Z., Müller R., Ruffoni D. Bone remodeling and mechanobiology around implants: Insights from small animal imaging. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017. URL: <https://doi.org/10.1002/jor.23758>

337. Large-Pore Platelet-Rich Fibrin with a Mg Ring to Allow MC3T3-E1 Preosteoblast Migration and to Improve Osteogenic Ability for Bone Defect Repair / P.-C. Wong et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, no. 8. P. 4022. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22084022>

# ДОДАТКИ

## ДОДАТОК А

Акти та картки зворотного зв'язку про впровадження матеріалів дисертаційної роботи у навчальний процес, наукові дослідження та у ветеринарну практику клінік дрібних домашніх тварин України

### ДОДАТОК А1

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
КАФЕДРА ХІРУРГІЇ ТА ХВОРОБ ДРІБНИХ ДОМАШНІХ ТВАРИН

#### ЗАСТОСУВАННЯ PRP-ТЕХНОЛОГІЙ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Біла Церква – 2022 р.

УДК: 636.09:615.36(07)

Розглянуто та рекомендовано до друку й практичного використання методичною комісією БНАУ (протокол № 10 від 26 червня 2022 р.)

Укладачі: Шевченко С.М., аспірантка; Рубленко М.В., академік НААН.

Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині. Методичні рекомендації. С.М. Шевченко, М.В. Рубленко. Біла Церква: БНАУ, 2022. 23 с.

Описано класифікацію різних типів тромбоцитарних концентратів, методи їх одержання та використання у ветеринарній медицині.

Рекомендовано практичним та науковим фахівцям, слухачам післядипломної освіти, студентам та аспірантам вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності 211 — ветеринарна медицина.

Рецензенти: Ільницький М.Г., д-р вет. наук, професор, зав. кафедри анатомії та гістології домашніх тварин ім. П.О. Ковальського (Білоцерківський національний аграрний університет)  
Чемеровський В.О., д-р філософії, асистент кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин (Білоцерківський національний аграрний університет)

©БНАУ, 2022

## ДОДАТОК А2

Ветеринарна клініка + аптека

«Прайд» (ФОП Мельник В.М.)

м. Біла Церква, вул. Карашицька,

191а

« 5 » лютого 2022 р.



## АКТ

**щодо апробації кераміки на основі гідроксиапатиту і β-трикальційфосфату з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за переломів кісток у собак**

Складений у тому, що після рентгенологічного підтвердження осколкових переломів собакам, які находили в клініку (n=10), під час проведення остеосинтезу додатково проводили остеозаміщення гранулами кераміки на основі гідроксиапатиту і β-трикальційфосфату з фібрином, збагаченим тромбоцитами. За їх використання консолідація переломів прискорювалася в 1,5 раза і перебігала без ускладнень, порівняно з подібними переломами, за яких виконувався тільки остеосинтез (n=5).

Головний лікар  
ветеринарної клініки «Прайд»

Провідний лікар  
ветеринарної клініки «Прайд»

Аспірантка кафедри хірургії  
та хвороб дрібних домашніх  
тварин БНАУ



Мельник В.М.

Круглов Є.М.

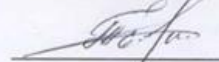
Шевченко С.М.



## ДОДАТОК АЗ



Головний лікар  
приватної клініки ветеринарної  
медицини "Ветікс" м. Богуслав

 Т.В. Половець

"25" серпня 2022 р.

## АКТ

щодо апробації кераміки на основі гідроксиапатиту і  
β-трикальційфосфату з фібрином, збагаченим тромбоцитами,  
за осколкових переломів у собак

Складений у тому, що собакам (n=10), які надходили в клініку, після рентгенологічного підтвердження складних осколкових переломів, проводили остеосинтез із заміщенням кісткових дефектів керамікою на основі гідроксиапатиту і β-трикальційфосфату з аутологічним фібрином, збагаченим тромбоцитами. За їх використання репаративний остеогенез прискорювався в 1,5 раза, у порівнянні із результатами пацієнтів (собаки, n=10), які мали подібні переломи, проте в них виконувався остеосинтез без застосування гідроксиапатиту з β-трикальційфосфатом і аутологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами.

Аспірантка кафедри хірургії  
та хвороб дрібних домашніх тварин  
ФВМ БНАУ



С.М. Шевченко

Провідний лікар приватної клініки  
ветеринарної медицини "Ветікс"



М.В. Приймак

Головний лікар приватної клініки  
ветеринарної медицини "Ветікс"



Т.В. Половець

## ДОДАТОК А4

КДТ «Ветеринарна допомога»  
(ФОП Тихоненко С.С.)  
м. Біла Церква, вул. Шолом-  
Алейхема, 44

« 27 » *листопада* 2022 р.

## АКТ

щодо апробації кераміки на основі гідроксиапатиту і  $\beta$ -  
трикальційфосфату з фібрином, збагаченим тромбоцитами,  
за переломів кісток у собак

Складений у тому, що після рентгенологічного підтвердження переломів собакам у кількості 10 голів, які находили в клініку, під час проведення остеосинтезу за осколкових переломів додатково дефекти заміщували гранулами кераміки на основі гідроксиапатиту і  $\beta$ -трикальційфосфату з фібрином, збагаченим тромбоцитами. Після застосування комбінації цих матеріалів зростання переломів прискорювалося у 1,5 раза, у порівнянні з подібними переломами у собак (n=5), за яких проводили тільки остеосинтез.

Директор клініки дрібних тварин  
«Ветеринарна допомога»

Аспірантка кафедри хірургії  
та хвороб дрібних домашніх  
тварин БНАУ



Тихоненко С.С.

Шевченко С.М.

## ДОДАТОК А5

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи  
та інноваційної діяльності  
Національного університету  
біоресурсів і природокористування  
України, кандидат  
сільськогосподарських наук, доцент



Вадим КОНДРАТЮК  
«08» вересня 2022 р.

## ПОГОДЖЕНО

Проректор з науково-педагогічної  
роботи та розвитку Національного  
університету біоресурсів і  
природокористування України,  
доктор економічних наук, професор,  
академік НААН

Сергій КВАША  
«08» вересня 2022 р.

## АКТ

про впровадження результатів дисертації  
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: «Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин» що представлена на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 21 «Ветеринарна медицина» та спеціальності 211 «Ветеринарна медицина», виконаної аспіранткою кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світланою Миколаївною, розглянуто на засіданні кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 2 від 08.09.2022 року).

Результати дослідження впроваджено у навчальну програму кафедри при викладанні дисциплін «Загальна і спеціальна хірургія», «Хвороби собак і котів» щодо застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин, при підготовці фахівців ОС «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету  
ветеринарної медицини,  
доктор біологічних наук,  
професор, академік НААН

Микола ЦВІЛХОВСЬКИЙ

Завідувач кафедри  
хірургії і патофізіології  
імені академіка І. О. Поваженка,  
доктор ветеринарних наук,  
доцент

Микола МАЛЮК

## ДОДАТОК А6

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**Проректор з наукової роботи та  
міжнародних зв'язків ОДАУ

Олексій Данчук

«05» липня 2022 р.

**КАРТКА ЗВОРТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ**

Матеріали дисертаційної роботи аспірантки кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світлани Миколаївни «Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисципліни «Загальна і спеціальна хірургія», «Ветерина хірургія» і наукових дослідженнях на кафедрі хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин Одеського державного аграрного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри хірургії, акушерства та хвороб дрібних тварин Одеського державного аграрного університету (протокол № 1 від “04” липня 2022 р.).

В.о завідувача кафедри хірургії, акушерства

та хвороб дрібних тварин

кандидат вет. наук, доцент

М.Г. Морозов

## ДОДАТОК А7

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**

Т.в.о. директора Інституту  
проблем матеріалознавства ім.  
І.М. Францевича НАН України  
академік НАН України  
Фірстов С.О.

«28» липня 2022 р.

**КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ**

Матеріали дисертаційної роботи аспірантки кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світлани Миколаївни «Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин» використовуються в наукових дослідженнях, Інституту проблем матеріалознавства імені І.М. Францевича Національної академії наук України.

Розглянуто і схвалено на засіданні відділу фізики міцності і пластичності металів (протокол № 3 від “27” липня 2022 р.).

Завідувач відділу фізики міцності і пластичності матеріалів,  
доктор фізико-математичних наук,  
професор, академік НАН України




С.О. Фірстов

## ДОДАТОК А8

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

В.о. директора Інституту біохімії  
імені О.В. Палладіна НАН

Д.б.н.

 В.О. Чернишенко

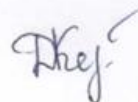
01 серпня 2022 р.

## КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи аспірантки кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світлани Миколаївни «Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин» використовуються у наукових дослідженнях Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН.

Розглянуто і схвалено на засіданні Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН. (протокол № 6 від “01” липня 2022 р.).

Старший науковий співробітник  
відділу структури та функції білку,  
канд. біол. наук, керівник науково-технічного  
проекту «Розробка, доклінічні та клінічні  
випробування аутологічного фібринового гелю  
для застосування у хірургії»



Д.С. Корольова

## ДОДАТОК А9

УЗГОДЖЕНО

Проректор з науково-педагогічної роботи  
Державного біотехнологічного університету

«26» серпня 2022 р.

УЗГОДЖЕНО

Проректор з наукової роботи  
Державного біотехнологічного університету

«26» серпня 2022 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. ректора  
Державного біотехнологічного  
університету

«29» серпня 2022 р.

Валерій МИХАЙЛОВ

«26» серпня 2022 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи в освітній процес  
закладів вищої освіти

Дійсним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи *Шевченко Світлани Миколаївни* на тему: “Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин”, представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконаної на кафедрі хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету аспіранткою протягом 2018-2022 рр., впроваджено в освітній процес кафедри: Ветеринарної хірургії та репродуктології.

1. Вид впроваджених результатів: застосування плазми та фібрину, збагачених тромбоцитами, та комбінації фібрину, збагаченого тромбоцитами з кальцій-фосфатною керамікою за переломів кісток у дрібних домашніх тварин. Доведена ефективність досліджуваних аутологічних речовин, виготовлених з власної крові пацієнтів за клініко-рентгенологічними показниками: початку опирання та відновлення функції травмованої кінцівки, а також скороченням термінів консолідації переломів. Підтверджена остеоіндуктивна дія плазми та фібрину, збагачених тромбоцитами, на репаративний остеогенез динамікою маркерів кісткового метаболізму.

2. Форма впровадження: методичні рекомендації «Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині».

3. Новизна результатів дисертаційної роботи: полягає у пріоритетному клініко-патогенетичному обґрунтуванні вибору оптимальної форми тромбоцитарних концентратів та її комбінування з кальцій-фосфатною керамікою для оптимізації консолідації переломів довгих трубчастих кісток у собак.

4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких впроваджено результати дисертаційної роботи: по кафедрі ветеринарної хірургії та репродуктології, за дисципліною Ветеринарна хірургія; Хвороби дрібних тварин (спеціальність 211 – Ветеринарна медицина);

5. Соціальний і науково-економічний ефект: підвищення якості освіти та ознайомлення майбутніх фахівців з рекомендаціями щодо застосування PRP-технологій у сучасних протоколах лікування переломів, зокрема осколкових, які потребують остеозаміщення, у дрібних домашніх тварин.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри: протокол № 1 від 25 серпня 2022 р.

Завідувач кафедри ветеринарної хірургії та  
репродуктології, д-р вет. наук, професор



Дмитро СЛЮСАРЕНКО

Відповідальний за впровадження, аспірант



Світлана ШЕВЧЕНКО

## ДОДАТОК А 10

«Затверджую»

Проректор з освітньої, виховної  
та міжнародної діяльностіБілоцерківського національного  
аграрного університету,д-р с.-г. наук, професор  
М. Димань

2022 р.



АКТ

## про впровадження результатів у освітній процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: **«Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин»**, представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконаної аспіранткою кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світланою Миколаївною, розглянуто на засіданні кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 1 від 18 серпня 2022 року).

Результати дослідження щодо клініко-експериментального обґрунтування імплантації гідроксиапатитного композиту з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за переломів кісток у собак використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також під час проведення наукових досліджень на кафедрі хірургії у підготовці фахівців ОС «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Білоцерківському національному аграрному університеті.

В. о. декана факультету  
ветеринарної медицини,  
д-р ветеринарних наук, доцент

Власенко С.А.

Завідувач кафедри хірургії та хвороб  
дрібних домашніх тварин,  
д-р ветеринарних наук, професор  
академік НААНУ

Рубленко М.В.



## ДОДАТОК А11

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Ректор Львівського національного  
університету ветеринарної  
медицини та біотехнологій імені  
С.З. Гжицького, професор



В.В. Стибель

2022 р.

## КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Матеріали дисертаційної роботи аспірантки кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світлани Миколаївни «Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисциплін: «Загальна і спеціальна хірургія», «Хірургічні хвороби тварин з анестезіологією» і наукових дослідженнях на кафедрі хірургії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри хірургії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького (протокол № 9 від «26» серпня 2022 р.).

Завідувач кафедри хірургії,

д.в.н., професор

А.Р. Мисак



**ВІРНО**  
НАЧАЛЬНИК ВІДДІЛУ КАДРІВ  
Львівського  
національного університету  
ветеринарної медицини  
та біотехнологій  
імені С.З.ГЖИЦЬКОГО

## ДОДАТОК А12

«Затверджую»  
Перший проректор –  
Проректор з навчальної роботи,  
професор

  
Дмитро ОНОПРИЄНКО  
«28» серпня 2022 р.



«Погоджено»

Проректор з наукової та  
інноваційної діяльності,  
професор

  
Юрій ГРИЦАН

«28» серпня 2022 р.

## КАРТКА ЗВОРТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

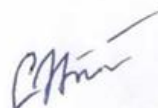
Матеріали дисертаційної роботи аспірантки кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету Шевченко Світлани Миколаївни «Застосування гідроксиапатитних композитів з фібрином, збагаченим тромбоцитами, за патології опорно-рухового апарату у тварин» використовуються в навчальному процесі при викладанні дисципліни «Ветеринарна хірургія» і наукових дослідженнях на кафедрі хірургії і акушерства сільськогосподарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри хірургії і акушерства сільськогосподарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету (протокол № 8 від 27 червня 2022 р.).

Завідувач кафедри хірургії і

акушерства с.-г. тварин

доцент



Сергій МАСЛІКОВ

**ДОДАТОК Б****Наукові праці, опубліковані за темою дисертації:*****Статті у наукових фахових виданнях України:***

1. **Shevchenko S., Rublenko M., Bonkovsky O.** Technologies for producing platelet masses for regenerative medicine. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2019. № 2. С. 105–117. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2019-152-2-105-117>
2. **Шевченко С. М.** Динаміка гематологічних показників, макроморфологічна і рентгенологічна картини репаративного остеогенезу в кролів за використання тромбоцитарних концентратів та гідроксиапатитної кераміки. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2020. № 1. С. 153–164. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-153-164>
3. **Шевченко С. М., Рубленко М. В.** Гістологічна характеристика згустків фібрину, збагачених тромбоцитами і одержаних за різних режимів центрифугування крові. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2020. Т. 22. № 99. С. 84–93. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet9914>
4. **Шевченко С. М., Рубленко М. В., Ульянович Н. В., Клименко П. П.** Гістоморфологічна характеристика остеозаміщення у кролів гідроксиапатитною керамікою та фібрином, збагаченим тромбоцитами. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2021. Т. 23. № 102. С. 43–52. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10207>
5. **Шевченко С. М., Рубленко М. В.** Динаміка гематологічних показників і реакції гострої фази за остеозаміщення аутофібрином та гідроксиапатитною керамікою з  $\beta$ -трикальційфосфатом осколкових переломів кісток у собак. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2022. № 1. С. 188–199. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-188-199>
6. **Шевченко С. М., Рубленко М. В.** Клініко-рентгенологічне та патохімічне обґрунтування остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою з  $\beta$ -трикальційфосфатом та аутофібрином, збагаченим тромбоцитами, за

осколкових переломів кісток у собак. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2022. Т. 24, № 106. С. 87–96. Doi: <https://doi.org/10.32718/nvlvet10614>

*Статті в іноземних виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних:*

1. **Shevchenko S.**, Rublenko M. The effect of osteosubstitution by platelet-rich autofibrin and hydroxyapatite ceramic with  $\beta$ -tricalcium phosphate on biochemical parameters of blood in rabbits. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2022. Vol. 46. No. 4. P. 599–608. Doi: <https://doi.org/10.55730/1300-0128.4231> (Scopus).

## ДОДАТОК В

### Відомості про апробацію результатів дисертації

#### Конференції (усна доповідь):

1. «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини та технології тваринництва» (м. Біла Церква, 31 жовтня 2019 р.);
2. «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 9 липня 2020 р.);
3. «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини» (м. Біла Церква, 21 жовтня 2021 р.);
4. «II конференція сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові (м. Львів, 18-19 листопада 2021 р.);
5. «Державна Фармакопея України – Європейська якість вітчизняних лікарських засобів» (м. Харків, 25-26 листопада 2021 р.);
6. «ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я-2022» (22–24 вересня 2022 р.);
7. «Зміна парадигми сучасної науки після військового вторгнення рф на територію незалежної України» (Румунія, Словаччина, 22–23 червня 2022 р.).

#### Тези доповідей на конференціях:

1. **Шевченко С. М.,** Рубленко М. В. Вплив різних режимів центрифугування на концентрування клітин крові у згустках фібрину, збагаченого тромбоцитами. *Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини та технології тваринництва*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 31 жовтня 2019 р.). Біла Церква, 2019. С. 100– 103.
2. **Шевченко С. М.,** Рубленко М. В. Характеристика впливу фібрину, збагаченого тромбоцитами, на репаративний остеогенез у кролів. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин*: матеріали щоріч. наук.-практ. конф. Молодих вчених (9 липня 2020 р., ІВМ

НААН, м. Київ). Київ: ЦП «Компринт», 2020. С. 38–39.

3. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Порівняльна оцінка біохімічних змін крові кролів за використання ін'єкційного фібрину, збагаченого тромбоцитами для заміщення кісткових дефектів. *II конференція сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу "Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові: тези доповідей, м. Львів, (18–19 листопада 2021 р.) / ЛНУВМБ ім. С.З. Гжицького, 2021. С. 175–176.*

4. Рубленко М. В., **Шевченко С. М.**, Рубленко С. В. Оцінка кісткового метаболізму за доклінічних випробувань остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою та збагаченим тромбоцитами фібрином. *Державна Фармакопея України — Європейська якість вітчизняних лікарських засобів: матеріали наук.-практ. конф., м. Харків, 25–26 листоп. 2021 р. С. 96–98.*

5. Рубленко М., Андрієць В., **Шевченко С.**, Ульянович Н., Фірстов С., Коломієць В. Загоєння кісткових дефектів кролів у випадку комбінованого застосування гідроксиапатитної кремній-легованої кераміки та аутологічного тромбоцитарного фібрину. *Державна Фармакопея України — Європейська якість вітчизняних лікарських засобів: матеріали наук.-практ. конф., м. Харків, 25–26 листоп. 2021 р. С. 98–101.*

6. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В. Власенко В. М. Оцінка гострофазної реакції за остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою і аутофібрином, збагаченим тромбоцитами, за переломів кісток у собак. *Зміна парадигми сучасної науки після військового вторгнення рф на територію незалежної України: матеріали міжнар. наук.-практ. конф. 22–23 червня 2022 р. (Румунія, Словаччина). С. 144–146*

7. **Шевченко С. М.**, Рубленко М. В., Власенко В. М. Динаміка маркерів кісткового метаболізму за остеозаміщення переломів кісток у собак кальцій-фосфатною керамікою та збагаченим тромбоцитами аутофібрином. *ЄДИНЕ ЗДОРОВ'Я-2022: матеріали конференції, м. Київ, 22–24 вересня 2022 р. С. 123–124*