

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Ліхницький Олексій Олексійович

УДК 616.361:618.46]:57.086.13:616.716.4-0015-007.234-003.9-092.4

ДИСЕРТАЦІЯ

ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ПЛАЦЕНТИ ДЛЯ
КОРЕКЦІЇ ПРОЦЕСІВ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ НИЖНЬОЇ
ЩЕЛЕПИ ПРИ АНГУЛЯРНОМУ ПЕРЕЛОМІ НА ТЛІ ОСТЕОПОРОЗУ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

14.01.35 – кріомедицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

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

_____ О. О. Ліхницький

Науковий керівник: академік НАН України, доктор медичних наук, професор
Гольцев Анатолій Миколайович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків, директор, завідуючий відділом
кріопатофізіології і імунології.

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Ліхницький О. О. Застосування кріоконсервованої тканини плаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи при ангулярному переломі на тлі остеопорозу (експериментальне дослідження) – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, 2020.

Вивчення дії кріоконсервованої тканини плаценти людини на процеси репарації кісткової тканини нижньої щелепи при комплексному лікуванні відкритих ангулярних переломів нижньої щелепи щурів на тлі змодельованого остеопорозу проведено на 245 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар з масою тіла 180-200 г. Експериментальний остеопороз у щурів викликали шляхом уведення 2,5 % розчину гідрокортизону ацетату *per os* через добу протягом 60 діб у дозі 50 мг/кг маси тіла. Після цього гідрокортизону ацетат відмінили і провели подальші дослідження: відтворення травматичного ушкодження нижньої щелепи та вивчення впливу кріоконсервованої тканини плаценти.

Тварини, які знаходились в однакових умовах утримання, були розподілені на такі основні групи: група 1 – контроль, тварини із поєднаною патологією: щурам на фоні змодельованого остеопорозу (ОП) проводили травматичне ушкодження нижньої щелепи (ангулярний перелом нижньої щелепи (ПНЩ)); група 2 – вивчення дії кріоконсервованої тканини плаценти людини (КП) на репарацію кісткової тканини у тварин, що мали поєднану патологію (ОП + ПНЩ): через 24 години після проведеної маніпуляції проводили підсадку деконсервованих фрагментів тканини плаценти людини; група 3 – дослідження дії кріоконсервованої тканини плаценти у сполученні з кальцієм цитрат у тварин, що мали комбіновану патологію. Кальцій цитрат вводили тваринам *per os* раз на добу у терапевтичній дозі 26 мг/кг з урахуванням коефіцієнту видової чутливості. Окремо для імуноферментних

та біохімічних методів використовували *контрольну групу псевдооперованих тварин*. Виведення щурів із експерименту проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом.

Рентгенографічне дослідження виконано за допомогою рентгенографічної і флюороскопічної системи «Opera T90 sex» (General Medical Merate S.p.A., Італія). Дослідження отриманих гістологічних препаратів та їх фотографування проведено світловим мікроскопом «AxioStar Plus». Біохімічні дослідження показників метаболізму кісткової тканини (вміст вільного та пептидозв'язаного оксипроліну, загального кальцію, фосфатів, визначення активності кислої та лужної фосфатази), маркерів ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресу (вміст молекул середньої маси, ТБК-реактивних продуктів, карбонільних груп протеїнів (КГП), активності антиоксидантного ензиму супероксиддисмутази (СОД), прооксидантного ферменту НАДФН-оксидази, білка, нітратів та нітритів), а також імуноферментні дослідження (вміст фактору росту судинного ендотелію людини (VEGF), фактору некрозу пухлини-альфа (ФНП α), інтерлейкіну-8 (ІЛ-8) та трансформуючого фактору росту бета (ТФР- β 1)) проведені в сироватці крові.

Статистичну обробку результатів імуноферментних та біохімічних досліджень здійснено за допомогою ліцензійного пакету «STATISTICA 6.1» з використанням непараметричних методів оцінки.

У результаті проведених досліджень вперше експериментально обґрунтовано доцільність сумісного використання кріоконсервованої тканини плаценти людини та кальцію цитрат для корекції репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Доведено, що вказана комбінація володіє високим остеопротекторним потенціалом, це певною мірою асоціюється із здатністю коригувати процеси ангіогенезу, імунозапальні реакції, ендотоксикоз, оксидативний та нітрозативний стрес.

Уперше вивчено структура регенерату щелепно-лицьової кістки в умовах маніфестного остеопорозу та вплив на ці процеси кріоконсервованої

тканини плаценти у сполученні з кальцієм цитрат. Доведено, що за умов розвитку остеопоротичних явищ пригнічується процес відновлення кісткової тканини, це пов'язано з подовженням терміну формування провізорних структур регенерату та порушенням їх перебудови.

Доведено стимулюючий вплив кріоконсервованої тканини плаценти на процеси проліферації та диференціювання клітинних і тканинних компонентів регенерату кістки. Обґрунтовано, що кріоконсервована тканина плаценти здатна прискорювати утворення остеїдної тканини та новоутворення кісткових балок із виникненням активних ділянок мінералізації. Установлено, що процеси остеорепації проходять у більш короткий термін, динамічніше, на якісно новому рівні.

Уперше показано динаміку змін показників цитокінового профілю сироватки крові в різні періоди репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Встановлено, що вміст у сироватці крові прозапальних цитокінів фактору некрозу пухлин α (ФНП- α) та інтерлейкіну 8 (IL-8) зростає вже на першому тижні після перелому, досягає максимуму на 14-21 добу, після чого різко знижується до нормальних значень. У той же час рівні васкуло-ендотеліального фактору росту (VEGF) та мультифункціональний трансформуючий фактор росту $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$) починають зростати лише на 21 добу після перелому, досягають максимальних величин на 30 добу, а далі знижуються до нормальних значень.

Уперше встановлено особливості перебігу оксидативного та нітрозативного стресів на різних етапах репаративного остеогенезу у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Показано, що активність вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, а також продукції нітроген монооксиду та супероксидного аніон-радикалу (за участі НАДФН-оксидази) починає зростати вже на 7 добу після травми і досягає максимальних значень станом на 14-21 добу репаративного остеогенезу, після чого поступово знижується до норми. Натомість активність

знешкодження супероксидного аніону за участі супероксиддисмутази починає знижуватись вже на 7 добу після перелому, а станом на 14-21 добу вона стає мінімальною.

Уперше визначено важливу роль процесів окисної деструкції білків, нітрозативного стресу та дисбалансу в системі цитокінів ФНП- α та ТФР- β 1 у метаболічних перетвореннях колагену за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Уперше показано, що активність процесів остеодеструкції та остеосинтезу за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу залежать від цитокінового профілю сироватки крові (ФНП- α , IL-8, VEGF та ТФР- β 1), продукції супероксидного аніон-радикалу за участі НАДФН-оксидази, активності вільнорадикального окиснення протеїнів та ступеня нітрозативного стресу.

Уперше показано, що сумісне використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу коригує низку метаболічних та імунологічних процесів, а саме зменшує деградацію колагену на 7-21 добу; збільшує активність колагеноутворення на 14-30 добу; підвищує індекс мінералізації кісткової тканини на 7-30 добу; відновлює баланс в системі проантисексидантних ензимів, що пов'язано зі сповільненням активності вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, нітрозативного стресу на 7-21 добу; зменшує рівень прозапальних цитокінів ФНП- α , IL-8 на 7-21 добу; збільшує вміст ангіогенного чинника VEGF та фактора росту ТФР- β 1 на 14-30 добу після травми.

Виявлені закономірності доповняють відомості про механізми дії кріоконсервованої тканини плаценти у зоні травми, що дозволить цілеспрямовано впливати на репаративний остеогенез, оптимізувати процеси зрощення, скоротити терміни лікування; обґрунтує можливість її використання в клінічній практиці при даній патології.

Ключові слова: кріоконсервована тканина плаценти людини, кальцію цитрат, кісткова тканина нижньої щелепи, остеопороз, репаративний остеогенез, щурі.

Lykhytskyi O. O. – The use of cryopreserved placental tissue for correction of the reparative osteogenesis processes of the lower jaw during an angular fracture with osteoporosis (experimental study). The qualifying paper is a manuscript.

Dissertation for the candidate degree of medicine by specialty 14.01.35 – cryomedicine. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The study of the effect of cryopreserved xenografts of human placenta on the processes of repairing bone tissue of the mandible on the background of the simulated osteoporosis was performed on 245 sexually mature male Wistar rats with a body weight of 180-200 g. Experimental osteoporosis in rats was induced by administration of 2.5% solution of hydrocortisone acetate *per os* day after, for 60 days at a dose of 5 mg/kg body weight. Subsequently, the drug was discontinued and further research was conducted (reproduction of traumatic damage to the mandible and study of the effect of cryopreserved tissue of the placenta).

Animals that were in the same retention conditions were divided into the following groups: group 1 - control, animals with combined pathology: rats injured in the lower jaw (fracture of the mandible (FM)) on the background of the modified osteoporosis (OP); group 2 - study of the effect of cryopreserved human placenta tissue (CP) on repair of bone tissue in animals having a combined pathology (OP + FM): 24 hours after the manipulation, a subclause of fragments of human placental tissue was performed; group 3 - study of the effect of cryopreserved tissue placenta in combination with calcium citrate preparation in animals that had a combined pathology. The calcium citrate drug was administered to animals once per day at a therapeutic dose of 26 mg/kg *per os*, taking into account the coefficient of species sensitivity. Separately for the immuno-enzyme and biochemical methods, a *control*

group of pseudo-operated animals was used. Extracting rats from the experiment was carried out by decapitation under thiopental anesthesia.

X-ray examination was performed using the X-ray and fluoroscopic system "Opera T90 cex" (General Medical Merate S.p.A., Italy). Research of received histological preparations and their photographing was carried out with the aid of a light microscope "AxioStar Plus". Biochemical methods of studying bone metabolism indices (free and peptide hydroxyproline content, total calcium, phosphates, determination of acid and alkaline phosphatase activity), endotoxemia markers, oxidative and nitrosative stress [content of medium weight molecules, TBA-reactive products, carbonyl groups of proteins (CGP), antioxidant enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), NADPH oxidase pro oxidant enzyme, protein, nitrates and nitrites) as well as enzyme immunoassay (content of vaso endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin-8 (IL-8) and transforming growth factor beta (TGF- β 1)] conducted in serum.

The statistical processing of the results of immuno-enzyme and biochemical studies was carried out using the license package "STATISTICA 6.1", using non-parametric estimation methods.

As a result of the conducted researches for the first time experimentally proved expediency of the joint use of cryopreserved tissue of a human placenta and a calcium citrate preparation for the correction of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis. It is proved that this combination of drugs has a high osteoprotective potential, which to some extent is associated with their ability to correct the processes of angiogenesis, immune-inflammatory reactions, endotoxycosis, oxidative and nitrosative stress.

The structure of the maxillofacial bone regenerate under manifested osteoporosis was studied for the first time and the effect on these processes of the cryopreserved tissue of the placenta in conjunction with the calcium citrate preparation. It is proved that under the conditions of development of osteoporosis phenomena, the process of restoration of bone tissue is suppressed, which is connected with the

lengthening of the time of formation of provisional structures of the regenerate, and violation of their restructuring.

The stimulating effect of cryopreserved tissue of the placenta on the processes of proliferation and differentiation of cell and tissue components of bone regenerate has been proved. It is substantiated that the cryopreserved tissue of the placenta has the ability to influence the acceleration of the formation of osteoid tissue and on the growth of bone beams with the emergence of active mineralization sites. It is shown that osteo-reparation processes take place in a shorter term, more dynamically, on a qualitatively new level.

The dynamics of changes in the serum cytokine profile in different periods of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis is shown for the first time. It has been established that the content of proinflammatory cytokines in the serum of the tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 8 (IL-8) increases already in the first week after the fracture, reaches a maximum on 14-21 days, and then rapidly drops to normal values. At the same time, levels of vaso endothelial growth factor (VEGF) and multifunctional transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) begin to increase only 21 days after the fracture, reach maximum values on 30 day, and then decrease to normal values.

For the first time, the peculiarities of the course of oxidative and nitrosative stress at different stages of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis were determined. It has been shown that the activity of free radical oxidation of lipids and proteins, as well as the production of nitrogen monoxide and superoxide anion-radical (with the participation of NADPH-oxidase) begins to increase already on 7 day after the trauma and reaches the maximum values on 14-21 days of reparative osteogenesis, after which gradually decreasing to normal. Instead, the activity of neutralizing superoxide anion with the participation of superoxide dismutase begins to decrease already on 7 day after the fracture, and on 14-21 days it becomes minimal.

For the first time an important role of oxidative degradation of proteins, nitrosative stress and imbalance in the system of cytokines of TNF- α and TGF- β 1 in metabolic collagen transformations in the open fracture of the mandible on the background of osteoporosis was determined.

For the first time, it has been shown that the activity of osteodestruction and osteosynthesis processes in the open fracture of the mandible on the background of osteoporosis depends on the cytokine profile of the blood serum (TNF- α , IL-8, VEGF and TGF- β 1), production of superoxide anion radical with the participation of NADPH oxidase, the activity of free radical oxidation of proteins and the degree of nitrosative stress.

For the first time, it has been shown that the combined use of cryopreserved tissue of the placenta and calcium citrate preparation in rats with an open fracture of the mandible on an osteoporosis background corrects a number of metabolic and immunological processes, namely, reduces collagen degradation by 7-21 days; increases collagen formation activity by 14-30 days; increases the index of mineralization of bone tissue by 7-30 days; restores the balance in the system of antioxidant enzymes, which is associated with the slowdown of the activity of free radical oxidation of lipids and proteins, nitrosative stress by 7-21 days; reduces the level of proinflammatory cytokines of TNF- α , IL-8 for 7-21 days; increases the content of the angiogenic factor VEGF and growth factor TGF- β 1 at 14-30 days after injury.

Revealed regularities will considerably expand the view on the mechanisms of action of the cryopreserved tissue of the placenta in the trauma zone, which will allow purposefully to influence reparative osteogenesis, optimize the processes of conrescence, reduce the terms of treatment, and substantiates the possibility of its use in clinical practice in this pathology.

Keywords: cryopreserved xenografts of human placenta, calcium citrate, mandibular bone tissue, osteoporosis, reparative osteogenesis, rats.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Лихицкий АА. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти. Клінічна стоматологія. 2016 Лют;1(14):37-41.

2. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. The role of immune-inflammatory processes and oxidative stress in the mechanisms of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis. World of Medicine and Biology. 2017 Nov;4(62):132-6.

3. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Rengenological features of morphogenesis of regenerate in rats with open fracture of lower jaw with osteoporosis which received the calcium citrate with improvement of cryoplacenta. Reports of Morphology. 2017 Oct; 2(23):248-52.

4. Lykhytskyi OO. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2017 Oct;27(29):32-6.

5. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis. World of Medicine and Biology. 2018 Jan;1(63):109-12.

6. Likhitskyi OO, Goltsev AM. Influence of Cryopreserved Human Placental Tissue on Reparative Bone Formation in Rats with the Lower Jaw Open Fracture on Osteoporosis Background. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019 Jun;29(2):125-36.

7. Lykhytskyi OO. Modern views on etiopathogenesis of traumatic injuries of the lower jaw against the background of osteoporosis and the use of drugs for correction of the processes of reparative osteogenesis. Reports of Vinnytsia National Medical University. 2019 Jun;23(2):309-15.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. Лихицкий АА. Репаративная регенерация костной ткани под влиянием криоконсервированной плаценты. В журнале «Проблемы криобиологии и криомедицины» 2014 Май; 2(Том 24, стр. 170). Харьков.

9. Lykhytskyi OO. Study the influence of cryopreserved placenta on process of reparative bone regeneration. In present issue of «Medical Review» included abstracts of reports of 4th Annual International Scientific-Practical Conference «Medicine Pressing Questions» 2015 Oct; (Vol. 2, p. 42). Baku.

10. Ліхницький ОО. Особливості репаративного остеогенезу в експерименті при відкритому переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації кріоконсервованої тканини плаценти людини. В збірнику тез «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» 2018 січ. (стор. 111-114). Львів, ГО «Львівська медична спільнота».

11. Likhitskyi OO. Efficiency of Combined Use of Cryopreserved Human Placenta Tissue and Calcium Citrate on Metabolism in Bone Tissue of Rats with Mandible Fracture on Background of Osteoporosis. In jurnal «Problems of Cryobiology and Cryomedicine» 2018 Jul; 2(Vol. 28, p. 177). Kharkiv.

ЗМІСТ

	стор.
АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 ПАЦЕНТАРНА ТЕРАПІЯ ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ НАПРЯМОК СУЧАСНОЇ КРІОМЕДИЦИНИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	26
1.1. Тканина плаценти людини як об'єкт кріоконсервування	26
1.2. Клінічне застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини	31
1.3. Сучасні уявлення про етіопатогенез травматичних ушкоджень нижньої щелепи на тлі остеопорозу і застосування препаратів для корекції процесів репаративного остеогенезу	39
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	45
2.1. Загальна методика та об'єкти дослідження	45
2.2. Методи дослідження	49
2.2.1. Рентгенографічний.	49
2.2.2. Гістологічний.	50
2.2.3. Біохімічні методи дослідження показників метаболізму кісткової тканини, маркерів ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів.	50
2.2.4. Імуноферментні методи дослідження вмісту в сироватці крові прозапальних цитокінів та факторів росту.	52
2.2.5. Метод математичної статистики.	54

РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ НА РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ПРИ ВІДКРИТОМУ АНГУЛЯРНОМУ ПЕРЕЛОМІ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ

56

3.1. Рентгенографічні та гістологічні показники морфогенезу регенерату у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопороз

56

3.2. Рентгенологічні та гістологічні показники морфогенезу регенерату у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти

68

3.3. Рентгенологічні і гістологічні показники морфогенезу регенерату у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу, які отримували кальцій цитрат після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти

79

РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ІМУНОЗАПАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ, ЕНДОТОКСЕМІЇ, ОКСИДАТИВНОГО ТА НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСІВ У РЕГУЛЯЦІЇ РЕПАРА- ТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ У ЩУРІВ ІЗ ВІДКРИТИМ АНГУЛЯРНИМ ПЕРЕЛОМОМ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ НА ТЛІ ОСТЕОПОРОЗУ

91

4.1. Оцінка вмісту в крові прозапальних цитокінів та факторів росту в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

92

4.2. Визначення в крові рівня маркерів ендотоксемії, вільнорадикального окиснення та показників проантиоксидантної системи у різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

97

4.3. Дослідження біохімічних показників метаболізму кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу 104

4.4. Оцінка взаємозв'язків між біохімічними маркерами стану кісткової тканини та показниками імунозапальних процесів, оксидативного та нітрозативного стресів у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу 112

РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ПЛАЦЕНТИ ТА КАЛЬЦІЮ ЦИТРАТ НА ІМУНОЗАПАЛЬНІ ПРОЦЕСИ, ОКСИДАТИВНИЙ І НІТРОЗАТИВНИЙ СТРЕСИ, ЕНДОТОКСЕМІЮ ТА СТАН КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ ІЗ ВІДКРИТИМ АНГУЛЯРНИМ ПЕРЕЛОМОН НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ НА ТЛІ ОСТЕОПОРОЗУ 118

5.1. Дослідження впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у сироватці крові прозапальних цитокінів і факторів росту в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу 119

5.2. Оцінка впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на рівень в крові маркерів ендотоксемії, вільнорадикального окиснення та показників про-антиоксидантної систем у різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу 125

5.3. Дослідження впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на біохімічні показники метаболізму кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу 134

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІД- ЖЕННЯ	144
ВИСНОВКИ	165
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	168
ДОДАТКИ	194

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

ІМ – індекс мінералізації

КГП – карбонільні групи протеїнів

КП – деконсервовані фрагменти тканини плаценти людини

ММСК – мезинхімальні стовбурові клітини

МСМ – молекули середньої маси

НСК – нейтральні стовбурові клітини

ОП – змодельований остеопороз

ПНЩ – ангулярний перелом нижньої щелепи

СК – стовбурові клітини

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТБК-РП – ТБК-реактивні продукти

ТФР- β 1 – трансформуючий фактор росту β 1

ТХО – трихлороцтова кислота

ФНП- α – фактор некрозу пухлин α

SN – substantia nigra

VEGF – васкуло-ендотеліальний фактор росту

IL-8 – інтерлейкін 8

ВСТУП

Актуальність теми. Найбільші перспективи в галузі регенеративної медицини і біології пов'язані з розвитком кріобіології. Кріотехнології дають можливість досить просто отримувати необхідні препарати і зберігати їхню життєздатність довготривало [1, 79, 121, 188, 202]. Власне, механізм дії кріоконсервованої тканини плаценти людини полягає у збереженні після відігріву повноцінності тканин і клітин, що містяться в них, а також у зниженні імуногенності [66, 146, 168, 178, 194]. Підвищення їхньої біологічної активності внаслідок дії низьких температур дозволяє отримати різнонаправлений фармакологічний ефект. Перевагою є те, що пацієнту вводять низку біологічно активних збалансованих сполучень, які впливають на різні метаболічні процеси організму загалом і на клітини, здатні виконувати замісну функцію [20, 23, 193, 202].

Наразі препарати кріоконсервованої тканини плаценти знаходять широке застосування в багатьох галузях медицини. У клінічній практиці їх використовують у лікуванні: інсулінозалежного цукрового діабету [218], ішемічної хвороби серця [200], імунологічних форм невиношування вагітності, фетоплацентарної недостатності та гіпоксії плода [21, 59], подагричного артриту [132], ниркової недостатності [52] тощо. Загалом, препарати, виготовлені із кріоконсервованої тканини плаценти людини застосовують для лікування недугів, в патогенезі яких наявні імунопатологічні, запальні, ендокринні, обмінно-метаболічні, генетичні порушення. Цей ефект обумовлений високим рівнем мікроелементів, гормонів, вітамінів, цитокінів, факторів росту, стовбурових клітин, що зумовлює імуnoreгулюючу, антиоксидантну, регенеративну, гемостатичну, нейропротекторну, протизапальну, знеболюючу та протиалергічну дії плацентарних екстрактів, суспензій клітин і фрагментів [95, 105, 155, 178, 201].

Отже, є підстави припускати, що пошук шляхів стимуляції репаративного остеогенезу при переломах нижньої щелепи на тлі остеопорозу варто проводити в напрямку ліквідації наслідків запальної і судинної реакцій, біохімічних зрушень, порушення системного та локального імунного гомеостазу з використанням кріоконсервованої тканини плаценти. Проблема лікування пацієнтів із переломами нижньої щелепи має не лише медичне, а й соціальне значення [33, 92, 149]. Переважна більшість пацієнтів цієї групи є особами працездатного віку, тривале перебування яких на інвалідності або неповна реабілітація з тимчасовою втратою працездатності не можуть задовольнити ні пацієнта, ні лікаря. Основним завданням лікування такої категорії пацієнтів є відновлення анатомічної цілісності нижньої щелепи і, як результат, повернення можливості виконання багатьох функцій: мовлення, сміх, жування, ковтання, закріплення зубів на альвеолярному відростку нижньої щелепи [28, 53, 195, 221].

Відомі хірургічні методи лікування переломів нижньої щелепи, незважаючи на постійний розвиток і вдосконалення підходів та методик надання допомоги постраждалим, не дозволяють повністю провести адекватну, якісну репозицію і фіксацію уламків та уникнути післятравматичних і післяопераційних ускладнень (остеомієліт, уповільнена консолидація уламків, зрощення уламків у неправильному положенні тощо) [28, 53, 110, 211]. Це пов'язано з тим, що вони переважно розраховані і застосовуються для переломів кісток без остеопорозу. Проте, переломи нижньої щелепи, що зумовлені порушенням репарації і низьким рівнем кальцію, є достатньо поширеними, про що свідчить статистика показників захворюваності, інвалідизації пацієнтів обох статей середнього та літнього віку [11, 76, 136, 195].

Нагальна потреба в стимуляції остеорегенерації у переважній більшості пацієнтів спричинена зниженням щільності і порушенням структури кісткової тканини внаслідок остеопорозу (постклімактеричного, старечого, глюкокортикоїдного, вторинного, аліментарного), основною причиною роз-

витку якого є посилення процесів резорбції кісткової тканини в поєднанні з ослабленням процесів кісткоутворення [18, 39, 150, 221].

У цій ситуації закономірно постає питання про використання для нормалізації механізмів ремоделювання кісткової тканини фармпрепаратів. Особливе значення мають препарати, які здатні впливати на масу і якість кортикальної кісткової тканини, що відіграє провідну роль не лише в забезпеченні здатності кістки протистояти механічним впливам, але і в досягненні стабільності і надійності зрощення її уламків [28, 97, 156, 156, 186].

Варто припустити, що досягнення найбільш оптимального співвідношення між швидкістю проліферативних процесів, диференціювання остеогенних клітинних елементів в остеобласти і фібриноутворення можна отримати при комбінованому застосуванні кріоконсервованої тканини плаценти людини і препаратів кальцію. Реалізація такого різноаспектного завдання можлива за умови моделювання на тваринах конкретної клінічної ситуації [121, 162, 165, 167, 171, 195]. Попри активні дослідження репаративного ефекту даних препаратів у пацієнтів із різноманітною хірургічною та терапевтичною патологіями, переломи нижньої щелепи у цьому ракурсі практично не вивчені [141, 195, 199, 210], що і стало основою для проведення нашого дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в Інституті кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках відомчої науково-дослідної роботи «Вплив кріоконсервованої тканини плаценти людини для корекції репаративного остеогенезу нижньої щелепи щурів на тлі остеопорозу» (№ державної реєстрації: 0118U003454).

Мета дослідження. Дослідити дію кріоконсервованої тканини плаценти людини як самостійно, так і у поєднанні з кальція цитратом на перебіг репаративного остеогенезу, обґрунтувати можливість їх використання в умовах розвитку експериментального травматичного процесу в кістці нижньої щелепи щурів на тлі остеопорозу.

Реалізація поставленої мети здійснювалась шляхом вирішення наступних завдань:

1. Відтворити моделі патологічних процесів у нижній щелепі експериментальних тварин (остеопороз, відкритий ангулярний перелом нижньої щелепи на тлі остеопорозу).

2. Визначити предикторні маркери перебігу репаративного остеогенезу у щурів з переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

3. Дослідити в динаміці методом рентгенаналіза зміни в зоні відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи щурів на тлі остеопорозу та після застосування кріоконсервованої тканини плаценти – окремо і у комбінації з кальція цитратом.

4. Встановити особливості гістологічних змін кісткової тканини нижньої щелепи щурів при відкритому ангулярному переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу та після застосування кріоконсервованої тканини плаценти – окремо та в поєднанні з кальція цитратом.

5. Дослідити в порівняльному аспекті вплив окремо застосованої кріоконсервованої тканини плаценти або разом з кальція цитратом на показники метаболічних маркерів стану кісткової тканини, показники імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресу в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

6. Дослідити рівень вираженості імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресу за їх показниками в сироватці крові, а також маркерів метаболізму кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Об'єкт дослідження – структурно-функціональний стан кістки нижньої щелепи щурів після травматичного ушкодження на тлі остеопорозу до та після застосування кріоконсервованої тканини плаценти – окремо та у поєднанні з кальція цитратом.

Предмет дослідження – рентгенологічні, біохімічні, морфологічні показники стану кісткової тканини щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу і динаміка їх змін після застосування кріоконсервованої тканини плаценти - окремо та у поєднанні з кальція цитратом.

Методи дослідження: рентгенографічний – для оцінки динаміки показників репаративного остеогенезу; гістологічного аналізу за даними світлової мікроскопії – для вивчення структурної організації кістки та матриксу досліджуваних тканин при травматичному ушкодженні нижньої щелепи, а також оцінки структурних змін у кістковій тканині під впливом кріоконсервованої тканини плаценти людини та у комбінації з кальція цитратом; імуноферментні та біохімічні методи – для оцінки ролі імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресу та показників метаболізму кісткової тканини в сироватці крові в різні терміни репаративного остеогенезу; методи математичної статистики – для статистичного аналізу результатів імуноферментного та біохімічного дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше визначена і експериментально обґрунтована можливість і ефективність застосування кріоконсервованої тканини плаценти, самотійно та у поєднанні з кальція цитратом, для лікування відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу; доведено стимулюючий вплив кріоконсервованої тканини плаценти на процеси проліферації та диференціювання клітинних та тканинних компонентів зони ушкодження, визначені структурні та функціональні зміни, які відбуваються в кістковій тканині в динаміці репаративного остеогенезу після травматичного ушкодження, до та після проведеного лікування.

Вперше визначено характер змін показників цитокінового профілю сироватки крові в різні строки репаративного остеогенезу у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Встановлено, що вміст в сироватці крові прозапальних цитокінів – фактору некрозу

пухлин α (ФНП- α) та інтерлейкіну 8 (IL-8) зростає вже на першому тижні після перелому, досягає максимуму на 14-21 добу, після чого стрімко знижується. В той же час рівні васкуло-ендотеліального фактору росту (VEGF) та мультифункціонального трансформуючого фактору росту $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$) починають зростати лише на 21 добу після перелому, досягають максимальних величин на 30 добу.

Вперше встановлено особливості перебігу оксидативного та нітрозативного стресу на різних строках репаративного остеогенезу у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Показано, що активність вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, а також продукції нітроген монооксиду та супероксидного аніон-радикалу (за участі НАДФН-оксидази) починає зростати вже на 7 добу після травми і досягає максимальних значень станом на 14-21 добу репаративного остеогенезу, після чого поступово знижується до норми. Натомість активність знешкодження супероксидного аніону за участі супероксиддисмутази починає знижуватись вже на 7 добу після перелому, а станом на 14-21 добу вона стає мінімальною.

Вперше визначено роль процесів окисної деструкції білків, нітрозативного стресу та дисбалансу в системі цитокінів ФНП- α та ТФР- $\beta 1$ у метаболічних перетвореннях колагену за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Вперше продемонстрована залежність активності процесів остеодеструкції та остеосинтезу за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу від профілю таких цитокінів як ФНП- α , IL-8, VEGF та ТФР- $\beta 1$, продукції супероксидного аніон-радикалу за участі НАДФН-оксидази, а також активності вільнорадикального окиснення протеїнів та ступеня нітрозативного стресу.

Вперше показано, що застосування кріоконсервованої тканини плаценти стимулює процеси проліферації та диференціювання клітинних та тканинних компонентів зони ушкодження, що вже на 14 добу проявляється

зменшенням явищ запалення, на 21 – деструктивних процесів – на 21 добу і на 45 добу - консолідацією відламків кісток.

Вперше встановлений ампліфікуючий ефект кальція цитратом на прояви репаративної дії кріоконсервованої тканини плаценти. Показано, що сумісне застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальція цитрату для лікування відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу чинить більш виражену остеопротекторну дію, прискорює ангиогенез у зоні ураження, знижує імунзапальні реакції, ендотоксикоз, оксидативний та нітрозативний стреси, ніж застосування монотерапії (кріоконсервованої тканини плаценти): ознаки явищ консолідації уламків визначали вже на 14 добу, на 21 добу – ущільнення кінцевих відділів відламків; на 30 дробу лінія перелому не простежувалася, на 45 відбувалася повна консолідація відламків і утворення кісткової мозолі.

Практичне значення роботи. Отримані результати є підґрунтям для проведення подальших клінічних комплексних досліджень ефективності застосування кріоконсервованої тканини плаценти у протоколах лікування травматичного ушкодження кісток, особливо – при складних травмах кісток щелеп.

Отримані результати використано в лекційних курсах і практичній роботі кафедр: гістології, фармакології, променевої діагностики, променевої терапії та онкології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова; гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця; гістології, цитології та ембріології ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»; гістології та ембріології ВДНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом здійснено розробку основних теоретичних і практичних положень проведеного дослідження. Автор самостійно: обрано тему дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання роботи, визначено групи досліджуваних тварин, обрано методи

дослідження, проведено експериментальні дослідження, проведено статистичний аналіз результатів дослідження, проаналізовано наукову літературу, описані результати власних досліджень, оформлена дисертація. Разом із науковим керівником проведений аналіз та узагальнення результатів дисертаційної роботи та сформульовані висновки. У спільних з керівником публікаціях автору належать основні розробки стосовно рентгенографічної, гістологічної, імуноферментної та біохімічної оцінки процесів репаративної регенерації кістки щурів при моделюванні травматичного пошкодження і при застосуванні кріоконсервованої тканини плаценти людини - окремо та у сполученні з кальція цитратом.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційного дослідження були викладені та обговорені на: конференції молодих вчених «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (м. Харків, 2014); 4-й щорічній науково-практичній конференції «Medicine Pressing Questions» (м. Баку, 2015); науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології» присвяченої пам'яті професорів-морфологів Г. В. Терентьєва, О. Ю. Роменського, Б. Й. Когана, П. П. Шапаренка, С. П. Жученка (м. Вінниця, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» (м. Львів, 2018); міжнародній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2018» (м. Харків, 2018).

Публікації матеріалів дисертації. За матеріалами проведеного дослідження опубліковано 11 наукових робіт, із них 7 статей опубліковано в наукових фахових журналах (серед яких 2 входять до переліку міжнародної наукометричної бази Web of Science та 1 до бази Scopus).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація представлена українською мовою на 206 сторінках (з яких 144 сторінки основного тексту) і складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів, вступу, огляду літератури, загальної методики й основних методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагаль-

нення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел, з яких 135 викладені кирилицею і 86 – латиницею, а також двох додатків. Дисертацію ілюстровано 40 рисунками і 40 таблицями.

РОЗДІЛ І

ПАЦЕНТАРНА ТЕРАПІЯ ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ НАПРЯМОК СУЧАСНОЇ КРІОМЕДИЦИНИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Тканина плаценти людини як об'єкт кріоконсервування

В останнє десятиліття препарати з тканини плаценти людини знаходять широке застосування в медичній практиці [25, 171, 193], що зумовлено наступними перевагами: для отримання плацентарного матеріалу не потрібен донор або оперативне втручання [1, 171]; багатоплановий, позитивний і довготривалий ефект зумовлений надходженням в організм реципієнта гормонів, репродуктивних імуномодуляторів, ростових і проліферативних, релізінг- та інших регуляторних факторів, що містяться в плаценті у фізіологічно збалансованому співвідношенні [59, 79, 178, 193].

При отриманні плаценти в асептичних умовах у здорової жінки без акушерської патології, з дотриманням розроблених кріобіологічних технологій, лікувальний препарат зберігає свої регуляторні властивості [79, 178]. З огляду на інфекційну безпеку біологічного матеріалу в процесі переробки плаценти проводять її поглиблене лабораторне дослідження на ВІЛ-інфекції, сифіліс, герпес, гепатит, цитомегаловірус, хламідії [1, 194].

У низці робіт обгрунтовано доцільність виділення клітин не з нативного, а із замороженого матеріалу посліду [109, 116, 197, 207]. Це суттєво спрощує технології низькотемпературного банкінгу та відхиляє необхідність виділення клітин в короткий термін після народження плаценти [75, 175].

За даними К. Д. Розанової і співавт. [95], О. А. Nardid і співавт. [95], кріоконсервована тканина плаценти людини містить значну кількість білків, діапазон молекулярної маси яких складає 10-20 кДа. Власне, в даній частині

спектра міститься основна кількість поліпептидних факторів росту та гормонів білкового походження.

Наразі для тривалого збереження унікальних якостей та запобігання кріодеструкції плацентарних біооб'єктів розроблено і запроваджено технології консервування плаценти в низькотемпературному швидкому режимі (100-400 град/хв) [20, 121, 173, 206]. Дотепер переважна більшість дослідників застосовували лише технологію повільного заморожування [139, 175, 204].

О. Нардід [77] встановлено, що повільне заморожування екстрактів плаценти людини призводить до порушення внутрішньомолекулярних взаємодій у біомакромолекулах із наступною їх агрегацією і розпушенням поверхневих поліпептидних ланцюгів.

Проте, С. В. Нарожний і співавт. [78] встановили, що обидва типи водно-сольових екстрактів, отримані з кріоконсервованої тканини плаценти людини (високошвидкісне замороження до -196°C і повільношвидкісне замороження), зберігають антиоксидантну дію стосовно еритроцитів, що перебувають у стані окисного стресу, індукованого водним перексидом.

Кріоконсервація плаценти дає можливість отримати не лише неспецифічний біостимулюючий, а також специфічний імуно-ендокринний ефект препаратів на організм пацієнта. Кріоконсервована тканина плаценти людини є джерелом для створення широкого спектру препаратів загальної і спрямованої етіопатогенетичної дії. Терапевтична ефективність біопрепаратів, отриманих із замороженої плаценти, зумовлена низкою біологічно активних речовин і гормонів, що містяться в ній [93, 147].

F. Colleoni та колеги [146] встановили, що в результаті кріоконсервування значно підвищується дихальна активність мітохондрій порівняно із біоматеріалом плаценти, доставленим «на льоді» в лабораторію.

Препарати, виготовлені із кріоконсервованої тканини плаценти, функціонально є більш повноцінними завдяки збереженню високої концентрації та структури цитомединів, імунних факторів, аденозинтрифосфата, біо-

логічно активних стероїдних і білкових гормонів. Їхній вміст в плаценті в сотні разів перевищує рівень вмісту в крові та інших фетальних тканинах (печінці, кістковому мозку тощо) [212].

У роботі В. А. Шаблій та співавт.[118] доведено, що мультипотентні мезенхімні стромальні клітини, отримані з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти людини, мають подібні імунофенотип, морфологію та можливість мультилінійно диференціюватись.

У праці С. Robin і співавт. [196] обґрунтовано можливість отримання із кріоконсервованої тканини плаценти життєздатних гемопоетичних прогеніторних і мультипотентних мезенхімних стромальних клітин. Відносний вміст SSC_{low}-клітин у CD34 + / CD45_{low}-популяції із кріоконсервованої тканини плаценти достовірно вищий порівняно з нативною. Клональний аналіз клітин, отриманих із кріоконсервованої тканини плаценти, виявив наявність попередників, що утворюють колонії моноцитів, гранулоцитів, гранулоцитів-моноцитів і еритроцитів. Також можна отримати культуру стромальних клітин з імунофенотипом CD90 + / CD73 + / CD105 + / HLA-ABC_{low} / CD45- / CD34- / CD133- / CD14- і здатністю до спрямованого диференціювання *in vitro* в остеогенному і адіпогенних напрямках.

Кріоконсервовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини плаценти здатні підтримувати гемопоез, є імуномодуляторами та можуть диференціюватися в різні типи клітин, що забезпечує їхню участь у процесах репарації органів і тканин. Їх застосування не вимагає контролю антигенної сумісності, що може знайти широке застосування в клітинній терапії [207, 213].

Кріоконсервована тканина плаценти людини може бути використана для виділення стовбурових клітин [146, 175] в експерименті, для лабораторних досліджень [155] і аутобанкінгу, при проведенні тестування ліків [20]. Доведено, що стовбурові клітини, виділені з плацентарної тканини, зберігають свої фенотипові характеристики та можливість диференціюватися [117].

В. А. Шаблій та співавт. [117] встановили, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини із кріоконсервованої тканини плаценти людини суттєво не відрізняються за морфологією, імунофенотипом і здатністю до мультипотентного диференціювання від аналогічних клітин нативної тканини.

До того ж, самі ж клітини плаценти в результаті біологічного розпаду після пересадки продукують внутрішньоклітинні білки, що збільшують активність системи імунного захисту організму хворого. В екстрактах, що приготовані із кріоконсервованої тканини плаценти людини, протягом 36 місяців активність та концентрація плацентарного фактора росту не знижуються [194].

Під час зберігання плаценти при низькій температурі протягом 6 місяців не розвивається кристалізація евтектичних складів екстракту плаценти з клітинними суспензіями на відміну від самих екстрактів. Це явище може пояснюватися утворенням комплексів органічних сполук з солями, які раніше брали участь в утворенні евтектичних складів [117].

Є. Д. Луценко і співавт. [65, 66] визначили, що кріоконсервування суспензії клітин плаценти диметилсульфоксидом призводить до підвищення в ній кількості лімфоцитів і збереження кількості CD4 + CD25 + на рівні вмісту у порівнянні з їх вмістом у нативній суспензії.

В. І. Грищенко та Т. Н. Юрченко [23] довели відсутність аномальної токсичності при введенні лабораторним тваринам плацентарних кріопрепаратів у дозі, розрахованій для людини із середньою масою тіла. При застосуванні таких препаратів спостерігався ефект трофічного впливу на фетоплацентарний комплекс. Лише з огляду на можливий негативний вплив на внутрішньоутробний розвиток плода застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини протипоказане при вагітності.

Т. А. Астреліна і співавт. [1] довели якість і безпеку кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин плаценти за умови дотримання правил їх заготовки. Кріоконсервування без застосуван-

ня захисних речовин або їх сумішей призводить до загибелі та апоптотичних змін клітин суспензії плаценти [9, 205].

В якості кріопротектора найчастіше застосовують диметилсульфоксид у концентрації 2–10 %, що нівелює токсичний ефект та забезпечує максимальну вітальність клітин [23].

І. Б. Мусатова і співавт. [75] аналізували термограми заморожених із високою швидкістю експлантів плацентарної тканини в багатокомпонентних кріозахисних середовищах (в фізіологічному розчині міститься 5 % диметилсульфоксиду та 6,8 % сахарози або 5 % гідроксиетильованого фаршу). Зафіксовано мінімальну інтенсивність ендотермічного ефекту плавлення льду, а також найпотужніше морфологічне збереження плацентарної тканини.

Клінічне випробування проходить використання декстрану-40, альбуміну та полівінілпіролідону, розведених у фізіологічному розчині, при кріоконсервуванні плацентарних мезенхімальних стовбурових клітин [1].

Попри широке застосування препаратів замороженої плаценти в регенеративній медицині, останнім часом у США і Європі прийнято низку документів, які регулюють і обмежують їх використання [215], що зупиняє закордонну науку щодо використання перспектив дослідження і застосування препаратів замороженої плаценти.

Україна ж серед європейських країн має найбільший досвід кріоконсервування біологічних тканин. На сьогодні дослідникам Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України належить розробка та впровадження в практику унікальних методик виготовлення екстракту плаценти та виділення стовбурових клітин із плацентарної тканини з високим ступенем життєздатності, що дозволяє якісно перевірити матеріал та створити його запаси з різними властивостями [20, 121, 194].

Отже, кріоконсервована тканина плаценти людини має високий біологічний потенціал та перевагу в отриманні, зберіганні донорського матеріалу, а також в етичному аспекті. Кріоконсервування плаценти дозволяє

тривалий час мати запас аутологічного клітинного матеріалу, який може бути за необхідності розморожений і використаний у комплексному лікуванні багатьох захворювань. Таким чином, дослідження кріочутливості плацентарної тканини і можливості розробки її препаратів уможливають отримання біоматеріалу, що має виражений та унікальний клінічний ефект.

1.2. Клінічне застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини

Наразі відновлення морфо-функціональної здатності тканин і органів є одним із нагальних завдань регенеративної (відновлювальної) медицини, яке реалізується завдяки поєднанню сучасних наукових досліджень та даних першого клінічного досвіду з розвитку альтернативних лікувальних напрямів [4, 111].

Найбільшої уваги у цьому ракурсі заслуговує екстракт кріоконсервованої тканини плаценти людини, який завдяки збалансованому вмісту великої кількості факторів росту має виражені регенеративні властивості (загоєння ран, виразок, гепатоцитів, пошкоджених нервів) [1, 79, 121, 188, 203]. Зауважимо також імуномодулючий ефект, а саме, здатність підвищувати рівень лімфокінів, IgG і IgM, а також протимікробну дію [191].

Наразі дослідження ефективності препаратів із кріоконсервованої тканини плаценти людини для терапії запальних захворювань слизової оболонки шлунка. Так, дослідження С. М. Білаша [8] присвячене вивченню впливу кріоконсервованої тканини плаценти на морфо-функціональні особливості стінки шлунка при гострому λ -карагіненозумовленому запаленні. Визначено менш виражені запальні прояви в стінці шлунка в групі щурів, яким на тлі гострого експериментального гастриту вводили даний біома-

теріал; перебудову захисних властивостей залоз воротаря у відповідь на гостре запалення.

Експериментальними дослідженнями доведено [25, 171, 178, 188], що введення кріоконсервованої тканини плаценти призводить до зменшення проявів запалення за рахунок суттєвого зменшення судинної проникності, зменшення набряку в ділянці запального процесу і зниження рівня медіаторів запалення. Також встановлено, що екстракт плаценти може бути ефективним у лікуванні хронічного болю [25].

М. О. Гуліда і співавт. [26] після оперативного втручання проводили внутрішньосуглобове введення екстракту кріоконсервованої тканини плаценти, що давало тривалий і стійкий терапевтичний ефект та поліпшувало якість життя пацієнтів із ревматоїдним артритом.

К. В. Шепітько [124] дослідив, що при гострому асептичному запаленні одноразове підшкірне введення кріоконсервованої тканини плаценти (за рахунок вивільнення значної кількості біологічно активних речовин) викликає зміни метричних показників та позитивно впливає на регенераторні процеси в ileum.

К. В. Шепітько [127] дослідив гемоциркуляторне русло оболонки 12-палої кишки на фоні змодельованого перитоніту. При трансплантації кріоконсервованої тканини плаценти на тлі асептичного перитоніту артеріоли і капіляри спочатку зменшувалися в діаметрі на 2 добу, а потім значно збільшувалися на 7-10 добу. Веноулярна ланка значно збільшувалася на 7 добу експерименту. При введенні біопрепарату термін запального процесу зменшувався на 4-5 діб.

К. В. Шепітько [125, 126] також виявив високий ступінь зв'язування лектинів на 7-14 добу у слизовій оболонці порожньої та 12-палої кишки щурів як результат введення кріоконсервованої тканини плаценти при гострому асептичному перитоніті.

При одноразовому підшкірному введенні кріоконсервованої тканини плаценти на тлі гострого асептичного запалення очеревини спостережено

активну появу малодиференційованих клітин, які містили «фігури мітозу», що вже на 14 добу свідчило про регенерацію структурних компонентів слизової оболонки тонкої кишки [128].

Т. А. Скотаренко [103] встановив, що під час введення кріоконсервованої тканини плаценти на тлі асептичного перитоніту вже на 7-10 добу експерименту значно збільшуються середні показники гемоциркуляції кіркової та мозкової речовини наднирників.

О. С. Якушко [134] виявив, що трансплантація кріоконсервованої тканини плаценти людини суттєво зменшує термін запалення зорового нерва, покращує репаративні процеси і запобігає розвитку незворотніх змін у ньому.

А. Б. Селькіна і співавт. [99] обґрунтовано довели ефективність застосування кріоконсервованої тканини плаценти для корекції перебігу запальних процесів слизової язика та стимуляції імунної системи.

А. Б. Кебкало і співавт. [48] при використанні препаратів кріоконсервованих клітин пуповинної крові та пуповини у пацієнтів на некротичний панкреатит зафіксували зниження показників гексозамінів і вільного оксипроліну та збільшення білковозв'язаного оксипроліну через два тижні, що свідчило про активацію репаративної регенерації і нормалізацію деструктивних процесів.

І. В. Шепітько та співавт. [123] при введенні кріоконсервованої тканини плаценти на тлі експериментального гострого сіаладеніту на ранніх термінах спостереження у щурів встановили активацію і дегрануляцію мастоцитів, посилення проникності судинної стінки і аморфної речовини сполучної тканини строми часточок піднижньощелепних слинних залоз. Це прискорювало вихід надлишкової рідини в просвіті епітеліальних залоз і зменшувало гіпергідратацію інтерстицію.

Г. А. Єрошенко і співавт. [34] визначили, що трансплантація кріоконсервованої тканини плаценти людини тваринам із сіалоденітами призводить до виражених змін паренхіматозних і стромальних компонентів привушних

залоз шурів, які супроводжуються відновленням більшості метричних і морфологічних показників вже до 14 доби спостереження.

О. В. Вільховою та В. І. Шепітько [14] вперше встановили, що підшкірна трансплантація кріоконсервованої тканини плаценти при гострому асептичному запаленні слизової оболонки порожнини рота скорочує термін перебігу ексудативних, проліферативних змін в інтерстиційній тканині та активує процеси регенерації і проліферації мукоцитів.

К. В. Шепітько і співавт. [122] провели лабораторні та клінічні тести для порівняння ефективності традиційного лікування і лікування в комбінації із введенням кріоконсервованої тканини плаценти. Виявлено позитивний вплив тканинної терапії на метаболічні показники, стан імунітету, адаптаційні можливості організму і клінічний перебіг стабільної стенокардії напруги.

А. А. Капустянська [46] визначила ефективність застосування кріоконсервованого екстракту плаценти на фоні основного лікування подагричного артриту у пацієнтів з ожирінням, зокрема позитивний вплив даного лікування на андрогенний стан, ліпідний і пуриновий обміни.

В. В. Кацай [47] встановив, що введення кріоконсервованої тканини плаценти на тлі гострого асептичного запального процесу в черевній порожнині зумовило швидку реалізацію судинної реакції і відновлення структурно-функціонального стану гемомікроциркуляторного русла селезінки вже на 2-3-й тиждень спостереження (зменшення величини середнього діаметру артеріол, збільшення просвітів венул і капілярів).

Уведення алогенної кріоконсервованої тканини плаценти тваринам при моделюванні атеросклерозу на 7-й день нормалізує ліпідний обмін, підвищує рівень естрадіолу в сироватці крові. На 21-й день кількість «ліпіднавантажених» лейкоцитів наближалась до показників контролю, знижувалась площа ушкодження аорти без стадії атерокальцинозу. Через півроку зареєстровано неоваскуляризацію міокарда та відновлення морфофункціональної цілісності ендотелію аорти [51].

О. В. Фалько [109] визначила, що нативна і кріоконсервована сироватки плацентарної крові людини мають аналогічну антиатерогенну дію, а саме: підвищення рівня антиатерогенної фракції ліпідів, зменшення площі вогнищ ліпоїдозу аорти, відновлення цілісності ендотеліального шару аорти. Також відмічено нормалізацію структури тканин наднирників. Отримані результати свідчать про активний вплив кріоконсервованої сироватки плацентарної крові на патогенетичні ланцюги модельованого атеросклерозу.

М. Г. Грищенко [24] досліджував вплив кріоконсервованої тканини плаценти на стимуляцію суперовуляції у мишей із хронічним запаленням яєчників. Уведення біопрепарату самицям із синдромом реактивного аднекситу сприяє ефективній індукції суперовуляції, яка відбувається під впливом екзогенних гонадотропних гормонів. Крім того, збільшується відносна кількість гамет і ранніх ембріонів.

В акушерстві тканина кріоконсервованої плаценти широко застосовують для підготовки до вагітності жінок з антифосфоліпідним синдромом і запальними захворюваннями жіночих статевих органів в анамнезі, а також для ізоімунізації вагітних [24, 67, 85].

Частотним є застосування кріоекстрактів плацентарної тканини в уронефрології. У дослідженнях М. В. Рєпіна, І. І. Топчій і Т. М. Юрченко і співавт. [94, 106, 131, 133] визначено, що введення кріоекстракту тканини плаценти зумовлює нормалізацію морфофункціонального стану нирок та пригальмовує розвиток хронічної недостатності нирок.

Імуномодуюча дія кріоекстрактів тканини плаценти залежно від перебігу і природи патологічного процесу зумовлює як стимулюючий, так і гальмуючий вплив на систему імунного захисту людини. При введенні мультипотентних мезенхімальним стромальних клітин плаценти мишам відмічено їх імуномодуючу дію [176].

Відомо, що плацента відіграє важливу роль у підтримці толерантності організму матері до антигенів плода [168, 178]. У літературі є відомості про те, що введення фрагментів кріоекстракту тканини плаценти знижує надмір-

не утворення антитіл, це створює сприятливі передумови для застосування такого біоматеріалу в лікуванні аутоімунних і алергічних захворювань [105, 207].

М. В. Калініченко та співавт. [45] виявили в регіональних лімфовузлах щурів з асептичним стоматитом компенсаторно-відновні процеси після трансплантації кріоконсервованої тканини плаценти, що обґрунтовують доцільність застосування кріоконсервованої тканини плаценти для стимуляції імунної системи, власне для активізації механізмів захисту організму.

Регенерація – це структурно-функціональне відновлення цілісності тканин і органів у результаті їх пошкодження або часткової втрати. В її основі лежить здатність до росту і розмноження специфічних елементів різних тканин [4]. Збалансований вміст великої кількості факторів росту та інших цитокінів визначає регенеративні властивості екстракту тканини кріоплаценти. Доведено, що застосування біопрепарату сприяє швидкому загоєнню виразок і ран, стимулює регенерацію гепатоцитів, нефронів, пошкоджених нервів [116, 123, 167, 207, 213, 219].

Т. М. Шарлай та Т. Н. Юрченко [120] довели, що інстиляція препаратів на основі кріоекстракта тканини плаценти поліпшує репаративні процеси в епітелії рогівки і строми (кератоцитів), впливаючи на епітеліальні лімбальні клітини. Даний препарат не викликає імунних і алергічних реакцій. Крім цього, чинники, що пригнічують ріст нових судин у рогівці, запобігають виникненню васкуляризованих білм.

Г. А. Ковальов і співавт. [49] опублікували матеріали про виражений стимулюючий вплив кріопрепаратів із тканини плаценти на процес репарації холодкових ран у щурів лінії Сфінкс, що підтверджено прискоренням епітелізації раньового процесу і зменшенням мікробного обсіменіння.

Низку наукових розвідок присвячено проблемі відновлення рівня репаративних процесів у пацієнтів з ускладненнями цукрового діабету. Ю. А. Дьомін і колеги [31] запропонували алгоритм використання кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин для пригнічення нейродегенера-

тивних змін сітківки при експериментальному діабеті. Зазначені клітини продукують нейротрофічні і антиангіогенні чинники, необхідні для виживання клітин сітківки і попередження розвитку цукрового діабета.

Я. О. Попович [84] застосовував препарат «Кріоцелл-кріокорд», а при важкому ендотоксикозі «Кріоцелл-гемокорд» у пацієнтів з ускладненим цукровим діабетом II типу. Це дозволило знизити дозу інсуліну майже на третину. Спостерігалось суттєве зниження лейкоцитарного індексу та рівня пептидів із середньою молекулярною масою, покращувалась еритроцитарна цитоархітектоніка. Посилювався вплив препаратів на активність металоферментів та ферментів гепатоцитолізу. Зменшувалось число протеаз-інгібіторів при одночасному збільшенні вмісту загальної кількості білка, альбумінів та наближались до норми органоспецифічні ферменти. Підвищувався загальний вміст імуноглобулінів та знижувався рівень комплексів антиген-антитіло, аутоантигенів синхронно зі збільшенням антитіл природного захисту. Крім того, швидше очищувалися та загоювались рани з тенденцією до обмеження гнійно-запального процесу на рівні стопи і зникання набряку гомілки.

Низкою робіт підтверджено позитивний ефект застосування екстракту тканини кріоплаценти при дисгормональних порушеннях у жінок, для полегшення клімактеричних симптомів, лікування гестозів у вагітних [139, 168].

Завдяки позитивному впливу препарату кріоконсервованої суспензії плаценти людини на імунний статус та імунобіологічні взаємовідношення мати-плацента-плід стає можливим його застосування у вагітних із прегестозом і з преєклампсією легкого ступеня. Це, в свою чергу, дозволяє значно знизити частоту ускладнень під час пологів і покращити перинатальні наслідки [24, 67, 168].

Н. Г. Грищенко [24] довів, що введення екстракту тканини кріоплаценти пацієнткам з трубно-перітонеальним безпліддям при здійсненні екстракорпорального запліднення зумовлює нормалізацію показників клітин-

ної ланки імунітету в периферичній крові і фолікулярній рідині. У жінок із хронічними запальними захворюваннями органів малого таза в анамнезі біопрепарат використовується перед допоміжними репродуктивними технологіями. Відмічено зменшення кількості ооцитів з ознаками апоптозу, ембріокорегуючий ефект, збільшення кількості зигот із нормальними темпами дроблення.

Препарати кріоконсервованої тканини плаценти застосовуються в геріатрії [86, 87, 88, 91], оскільки вони здатні забезпечувати поступальне і тривале надходження в організм плацентарних сполук і мають патогенетично спрямований ефект – впливають на органи-мішені, стимулюють їх функцію і підвищують неспецифічну стійність організму до стресу і несприятливих екзогенних чинників.

О. С. Прокопюк і співавт. [89] при імплантації піддослідним тваринам кріоконсервованих частин плаценти людини спостерігали підвищення активності ендогенної антиоксидантної системи, що сприяє корекції патологічних змін, викликаних старінням, це також є перспективним для геріатрії.

Порівняно із вітчизняними дослідженнями, що стосуються вивчення ефективності застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини, розвідок закордонних науковців значно менше. Іноземні колеги отримали позитивні результати застосування кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження при лікуванні трофічних розладів [167, 208, 214, 219], яєчникової дисфункції, клімактеричного синдрому [165], цукрового діабету [218].

Таким чином, як кріоекстракт тканини плаценти, так і фармакологічні препарати кріоекстракту тканини плаценти мають регенеративні властивості. Кріоекстракт тканини плаценти людини, як один з найбільш простих в зберіганні та використанні, володіє більш вираженими регенеративними, проти-запальними і імунокорегуючими властивостями, вигідно відрізняючись від препаратів, підданих термічній обробці [1, 79, 93, 121, 207].

1.3. Сучасні уявлення про етіопатогенез травматичних ушкоджень нижньої щелепи на тлі остеопорозу і застосування препаратів для корекції процесів репаративного остеогенезу

Наразі щелепно-лицева хірургія вважається одним із найскладніших і затребуваних напрямків сучасної медицини. Адже обличчя людини в першу чергу визначає її індивідуальність і зовнішній вигляд, бере участь в забезпеченні таких життєво важливих функцій, як дихання і харчування, дозволяє спілкуватися за допомогою мови і міміки [80].

Серед ушкоджень лицьового скелета найчастіше трапляються переломи нижньої щелепи, що, за даними вітчизняних і зарубіжних авторів, становлять від 70 % до 85 % усіх переломів кісток щелепно-лицевої ділянки [2, 11, 76, 136, 195]. Нижня щелепа утворена єдиною кісткою лицьового відділу черепа, яка ламається не лише від прямих, але і від непрямих травм. Якщо пряма травма комбінується з непрямою, то звичайно мають місце множинні переломи [11, 136].

У нормі репарація кістки проходить в декілька стадій: запалення, проліферація, диференціювання, утворення тканиноспецифічних структур, мінералізація, ремоделювання регенерату і повне відновлення структур кістки. Таким чином, при формуванні регенерату мають місце як процеси катаболізму, так і анаболізму [10].

Розглянемо роботи, що стосуються вивчення ефективності препаратів для корекції процесів репаративного остеогенезу при переломах нижньої щелепи з остеопенією і без остеопенії.

У дослідженнях Б. В. Трифонова [107] і А. А. Черниченко [113] встановлено, що застосування нанорозмірного гідроксиапатиту з додаванням сполучного резорбуємого полімеру, протизапальних і антисептичних препаратів активує процеси регенерації кісткової тканини нижньої щелепи лабораторних тварин.

Для прискорення регенерації кісткових тканин в їх дефекти вводять препарати гранульованого гідроксиапатиту і різні біодеградовані матеріали, що є основою для побудови кістки. Однак було встановлено, що гідроксиапатит руйнується макрофагами, які часто утворюють багатоядерні форми, що не лізують локально гідроксиапатит, а разом із цією речовиною в лізосомах мігрують в інші тканини і органи [70].

В експерименті на кролях із переломом нижньої щелепи застосування препарату «Тізол» стимулювало виражену і прискорену регенерацію мікроциркуляторного русла на 3-5 добу і формування колагеново-ретикулінового каркасу вже на 6-8 добу, що випереджало нормальний процес на 5 діб [56].

У щурів при застосуванні остеопластичного матеріалу «ТІОПРОСТ» і матеріалу «КоллапАн-М» проводили порівняльне дослідження швидкості і ефективності регенерації кісткової тканини нижньої щелепи. Визначено, що при використанні «ТІОПРОСТА» швидкість заповнення обсягу кісткового дефекту більше ніж на 1 міс. випереджає регенерацію кісткової тканини порівняно із застосуванням матеріалу «КоллапАн-М». Після заповнення дефекту кісткової тканини матеріалом «ТІОПРОСТ» утворюється пориста тривимірна конструкція, що є собою тканинно-інженерною матрицею і виконує підтримувальну функцію [98].

Проведені дослідження К. В. Барсукової і О. М. Горшкової [5] показали, що застосування аквакомплексу гліцеросольвата титану в схемах лікування пацієнтів із переломами нижньої щелепи прискорює процес регенерації. У порівнянні з використанням стандартних схем терапії вже на 2-3 добу застосування препарату «Тізол» спостерігаються процеси остеointegraції.

О. А. Понуровська [83] довела, що застосування препарату «Неоселен» в комплексі лікувальних заходів у пацієнтів із переломом нижньої щелепи сприяє збільшенню концентрації селену в організмі, сприяє відновленню балансу про- і антиоксидантної систем. Це дозволяє попередити та

купіювати запальні ускладнення, скоротити терміни консолідації уламків і період стаціонарного лікування.

Кінцевим результатом остеорепарації є з'єднання кісткових фрагментів, проте дуже часто спостерігається незрощення перелому, що у більшості випадків зумовлене остеопорозом нижньої щелепи – одним із варіантів ураження недугою кісткової системи людини, дегенеративно-дистрофічні зміни якої проявляються дисфункцією і больовим синдромом [57].

Як показали останні масштабні дослідження, руйнування кісткових структур нижньої щелепи внаслідок остеопорозу у людей різного віку та статі відбуваються все частіше [7, 32, 53, 172]. Дефекти ж нижньої щелепи, зумовлені дисплазією тканин, атрофією, післяпроменевим некрозом, доброякісним або злоякісним новоутворенням, зустрічаються рідше [11, 221].

Виділяють дві основні форми остеопорозу: первинний і вторинний. Первинний остеопороз частіше розвивається у жінок (період менопаузи) та чоловіків літнього віку. Вторинний остеопороз є ускладненням ендокринних, запальних, гематологічних, гастроентерологічних захворювань або лікарської терапії (наприклад, при застосуванні стероїдів) [216, 217].

Установлено безпосередній вплив системного остеопорозу на стан кісткової тканини альвеолярного гребеня, яка високочутлива до гормональних регулюючих і контролюючих механізмів організму [27]. Для остеопорозу характерний тривалий період відновлення після перелому і нерідко лікування перелому при остеопорозі вимагає додаткового хірургічного втручання. Переломи в осіб із остеопорозом частіше супроводжуються ускладненнями і непрацездатністю в періоді реабілітації [28, 42, 40].

При переломах, що виникли внаслідок остеопорозних змін, існує потенційна небезпека появи локальних і системних побічних ефектів, які найбільш помітні стосовно термінів завершення репаративного остеогенезу пошкодженої кісткової тканини. Це пояснюється дисбалансом у процесах кісткового метаболізму, зумовленого як місцевими, так і загальними факторами [152, 184]. Усе зазначене вище впливає на міцність кістки, в

якій відображена інтеграція двох базових характеристик: мінеральної щільності кістки і якості кістки (обмін, архітектоніка, нагромадження ушкоджень і мінералізації) [30, 185].

Для досліджень у щелепно-лицевій ділянці застосовують тваринні моделі, які уможлиблюють вивчення особливостей відновлення дефектів щелепи в умовах остеопенії. Найчастіше експериментальні дослідження консолідації перелому проводять на лабораторних щурах після оваріектомії [142, 151, 189, 209]. Також уповільнене загоєння перелому спостерігається на тваринній моделі остеопорозу, що індукований кортикостероїдами [113, 140, 169, 190].

На тваринних моделях при загоєнні перелому на тлі остеопорозу встановлено зменшення площі перетину в ділянці кісткового мозоля на 40 % і зменшення мінеральної щільності кісткової тканини на 23 % у ділянці ушкодження. Також спостерігалися порушення механічних властивостей мозоля і погіршення стабільності і міцності фіксації імплантатів [55, 80, 108]. Для більшої переконливості ми представимо як доклінічні, так і клінічні дані.

У роботах Є. В. Желніна [35, 36] наведено докази порушень альвеолярної кістки остеопорозного характеру, що є результатом уведення дексаметазону протягом двох тижнів. При цьому виявлені зрушення в активності лужної фосфатази, рівні метаболітів оксиду азоту при незмінному вмісті Ca і P у крові [37].

Y. Li і співавт. [177] при моделюванні на кролях дефекту нижньої щелепи спостерігали позитивну кореляцію між активністю кісткової репарації і експресією / активністю кальцитонін ген-пов'язаного пептида і синтази оксиду азоту.

I. В. Майбородин і співавт. [69] довели, що після введення щурам у ділянку ушкодження кістки нижньої щелепи суспензії аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин кістково-мозкового походження в культура-

льному середовищі прискорюється розвиток процесів відновлення цілісності кісткової тканини.

Після операції із заповненням дефекту кістки нижньої щелепи збагаченим тромбоцитами фібриновим згустком у щурів спостерігають подальше ефективне заміщення дефекта кістковою тканиною і формування кісткової мозолі [68].

Доведено ефективність застосування аутологічних і аlogenних стовбурових клітин жирової тканини для оптимізації регенерації дефекту кісткової тканини нижньої щелепи у кролів. Розроблена біоінженерна конструкція на основі губки з колагену з гідроксіапатіта ГАПКОЛ (ГАПКОЛ, «НВО полістиро») для трансплантації стовбурових клітин жирової тканини в дефект кісткової тканини. Встановлено, що індуковані до остеогенного диференціювання стовбурові клітини жирової тканини стимулюють репаративний остеогенез. Причому вплив клітин аутологічного походження виражений більше, ніж клітин аlogenного походження (більша швидкість дозрівання кісткового матриксу) [114].

У вітчизняній та іноземній фаховій літературі практично відсутні роботи, присвячені дослідженню здатності стимулювати регенерацію при переломах нижньої щелепи за допомогою плацентарної терапії і препаратів кальцію [7, 138, 170, 195, 220].

Відомі лише результати дослідження російських колег [7] щодо ефективності імплантації ПЛАТЕКС-хоріального (препарат хоріальної оболонки) в зону перелому нижньої щелепи для стимуляції репаративного остеогенезу кісткової тканини.

А. Г. Гулюк і співавт. [28] вдосконалили методику комплексного лікування пацієнтів із переломом нижньої щелепи на тлі структурно-метабо-лічних змін тканини кістки при комбінованому застосуванні препаратів кальцію і цинку.

C. Roux із співавт. [198], A. Avenell із співавт. [137] вивчали процес репарації при остеопорозних, остеопенічних переломах і оцінювали потен-

ціал застосування препаратів вітаміну D і кальцію при уповільненому або недостатньому загоєнні кісткової тканини.

Дослідження щодо препаратів, які здатні впливати на різні стадії репаративного остеогенезу інших кісток тіла без та на тлі остеопорозу, ми в аналіз літературних джерел не включали.

Проведений аналіз літератури засвідчив різноманітність відомих методів лікування переломів нижньої щелепи, що мають регенеративний ефект стосовно кісткової тканини, це підтверджено морфологічними методами дослідження [28, 56, 57, 70, 145, 198].

Наголосимо, що екстраполювати позитивні результати застосування вище зазначених препаратів складно, оскільки немає доказів безпечності і біоаналогічності для пацієнтів. Як правило, дози, що застосовують для тварин, в кілька разів вищі, ніж терапевтичні дози для людини [142, 154].

Доказ подібності в клінічних дослідженнях на моделі перелому нижньої щелепи, викликаного кортикостероїдами, дозволяє екстраполювати результати дослідження ефективності за умови, що досліджувані препарати мають аналогічний механізм дії у тварин і людини [156, 157, 162]. Для препаратів кріоконсервованої тканини плаценти і препаратів кальцію доведена їх біоаналогічність (біоподібність) стосовно багатьох показань до застосування [165, 167]. Власне тому, за належного наукового обґрунтування, можлива екстраполяція до їх застосування щодо інших показань (у нашому випадку це корекція репаративного остеогенезу при остеопорозі).

Огляд, який представлений в даному розділі дисертації, відображений в науковій статті у науковому фаховому журналі:

Lykhytskyi OO. Modern views on etiopathogenesis of traumatic injuries of the lower jaw against the background of osteoporosis and the use of drugs for correction of the processes of reparative osteogenesis. Reports of Vinnytsia National Medical University. 2019 Jun;23(2):309-15. [181]

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна методика та об'єкти дослідження

Вивчення дії кріоконсервованої тканини плаценти людини для корекції процесів репаративного остеогенезу при комплексному лікуванні відкритих ангулярних переломів нижньої щелепи щурів на тлі змодельованого остеопорозу проведено на базі віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України на 245 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар із масою тіла 180-200 г.

Морфофункціональні характеристики кріоконсервованого біологічного об'єкта визначають його індивідуальні властивості і програми кріоконсервування. Складові і функціональні параметри тканини плаценти можуть варіювати в певних межах. Однак в низці випадків ці параметри виходять за рівень допустимих значень. Щоб запобігти потраплянню «нестандартних» зразків у дослідження, а також для отримання якісної первинної сировини нами було дотримано усіх методологічних вимог, щоб забезпечити заготівлю тканини плаценти зі стандартизованими характеристиками [22, 90].

Плаценту, яка є утильним матеріалом, отримували одразу після народження дитини і відділення від матері за письмовою інформованою згодою породіллі. Рішення про доцільність заготовки плаценти приймав лікар після аналізу історії пологів, опитування та огляду жінки. Позитивне рішення щодо заготівлі плаценти приймав лікар у пологовому відділенні у випадку фізіологічного, неускладненого перебігу вагітності і пологів у соматично здорових жінок. Саме такий підхід гарантує отримання якісної

тканини плаценти. Етап отримання плаценти важливий для забезпечення її стерильності [22, 90].

Для з'ясування впливу остеопорозу на перебіг регенераторних процесів у кістковій тканині щелепи експериментальний остеопороз у щурів викликали шляхом введення гідрокортизону ацетату. Для моделювання маніфестного остеопорозу, що супроводжується виразними дистрофічними змінами кісткової тканини, 2,5 % розчин препарату вводили *per os* через добу, протягом 60 діб у дозі 50 мг/кг маси тіла [6, 29]. Після цього препарат відміняли і проводили подальші дослідження: відтворення травматичного ушкодження нижньої щелепи та вивчення впливу кріоконсервованої тканини плаценти.

Травматичне ушкодження нижньої щелепи (відкритий ангулярний перелом нижньої щелепи) проводили так [Патент України № 63813U. 25.10.2011]: щура фіксували на станку на спині; під тіопенталовим (0,1 мл 10 % розчину на 100 г маси тіла) наркозом, після підготовки поля для хірургічної маніпуляції, у правій підщелепній зоні проводили розріз шкіри паралельно нижньому краю нижньої щелепи у медіальному від кута напрямку довжиною 10-12 мм; м'язи розсікали та скелетували нижню щелепу; сепарувальним диском розсікали зовнішню кортикальну пластину, а далі долотом створювали повний перелом кістки по лінії, що з'єднує місце злиття тіла та гілки щелепи в ретромоларній ділянці з місцем, розташованим на 0,9 см медіальніше кута нижньої щелепи. Операційну рану з'єднували з ротовою порожниною. М'язи та шкіру ушивали кетгутом. Після маніпуляції накладали асептичну пов'язку. Тварину виводили з наркозу.

Тварини, які знаходились в однакових умовах утримання, розподілили на такі групи:

- група 1 – контроль, тварини із поєднаною патологією: щурам на фоні змодельованого остеопорозу (ОП) проводили травматичне ушкодження нижньої щелепи (перелом нижньої щелепи (ПНЩ));

- група 2 – вивчення дії кріоконсервованої тканини плаценти людини (КП) на репарацію кісткової тканини у тварин, що мали поєднану патологію (ОП + ПНЩ): через 24 години після проведеної маніпуляції здійснювали підсадку деконсервованих фрагментів тканини плаценти людини. Підсадка проводилась хірургічним шляхом через одну добу після перелому нижньої щелепи. Для цього щурам на спині, в зоні лопатки, під інфільтраційною анестезією 0,5% розчином новокаїну робили підшкірну кишеньку, в яку вносили стерильний фрагмент деконсервованої тканини плаценти людини масою 200 мг на одну тварину. Розріз зашивали та обробляли антисептиками. Фрагменти плаценти людини масою від 1500 до 1800 мг із дотриманням правил асептики та антисептики зберігали у стерильних одноразових контейнерах фірми «Nunc» для низькотемпературного консервування при температурі -196°C . Кріоконсервування і зберігання контейнерів проводили за технологією, розробленою в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ [20, 22];
- група 3 – дослідження дії кріоконсервованої тканини плаценти у сполученні з кальцієм цитрат у тварин, що мали комбіновану патологію. Кальцій цитрат (ВАТ «Фармак», Київ, Україна) вводили тваринам *per os* раз на добу у терапевтичній дозі 26 мг з урахуванням коефіцієнту видової чутливості.

Виведення щурів із експерименту проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом.

Окремо для імуноферментних та біохімічних методів використовували *групу псевдооперованих тварин*: щура фіксували на станку на спині; під тіопенталовим (0,1 мл 10 % розчину на 100 г маси тіла) наркозом, після підготовки поля для хірургічної маніпуляції, у правій підщелепній зоні проводили розріз шкіри паралельно нижньому краю нижньої щелепи у медіальному від кута напрямку довжиною 10-12 мм; м'язи розсікали та скелетували нижню щелепу; м'язи та шкіру ушивали кетгутом.

Утримання та усі маніпуляції з лабораторними щурами виконували відповідно до вимог Закону України № 3447 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), з обов'язковим дотриманням рекомендацій «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), положень «Правил доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)» [50, 103] та правил гуманного ставлення до експериментальних тварин, що затверджені Комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 3 від 28.10.2013 року та протокол № 1 від 26.02.2019 року).

Умови експерименту та розподіл щурів на групи представлений у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл тварин по групах та методам дослідження.

№ групи	Умови дослідження	Строки дослідження	Методи дослідження	Кількість тварин
0	Псевдо-оперовані	7, 14, 21, 30, 45 доба	імуноферментні та біохімічні	35 (по 7 тварин на кожен термін дослідження)
1	Контроль ОП + ПНЩ	7, 14, 21, 30, 45 доба	рентгенографічний, гістологічний, імуноферментні та біохімічні	70 (по 14 тварин на кожен термін дослідження)
2	ОП + ПНЩ + КП	7, 14, 21, 30, 45 доба	рентгенографічний, гістологічний, імуноферментні та біохімічні	70 (по 14 тварин на кожен термін дослідження)
3	ОП + ПНЩ + КП + Ca ⁺⁺	7, 14, 21, 30, 45 доба	рентгенографічний, гістологічний, імуноферментні та біохімічні	70 (по 14 тварин на кожен термін дослідження)

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Рентгенографічний.

Рентгенографічне дослідження виконано за допомогою рентгенографічної і флюороскопічної системи «Opera T90 сех» (General Medical Merate S.p.A., Італія).

Рентгенографію нижньої щелепи проводили у фіксованих тварин, звернених до стола переламаною частиною нижньої щелепи. Вільний край нижньої щелепи піднімали, під нього підводили щільну подушку, між нижньою щелепою і подушкою поміщали касету [44].

Опис місцевих та загальних структурних змін на рентгенівських знімках при переломах кісток (рентгеносеміотика) представлені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Рентгеносеміотика місцевих та загальних структурних змін у кістковій тканині

Ознака	Відображення на знімках
Остеопороз	Кількість кісткових балок зменшується, малюнок губчастості речовини стає крупнопетлистим; кортикальний шар стоншується, стає розволокненим, але внаслідок збільшення загальної прозорості кістки контури його виглядають підкресленими. Товщина кортикального шару завжди збережена.
Остеоліз	Ділянки «затемнення» в кістковій тканині.
Періостит	Паралельно тіні коркового шару кістки назовні виявляється тонка смужка затемнення (лінійна тінь), відокремлена від тіла кістки світлим проміжком.
Секвестр	Інтенсивна тінь фрагмента кісткової тканини, що вільно лежить; смуги просвітлення (демаркаційний вал), які оточують це затінення з усіх боків.

Продовження табл. 2.2

Остеосклероз	Характерна дрібнопетлиста, груботрабекулярна структура губчастої речовини аж до зникнення сітчастого малюнка, потовщення коркового шару зсередини, звуження кістково-венозного каналу, іноді аж до повного його закриття.
Деструкція	Різні за інтенсивністю зони просвітлення.
Остеонекроз	На межі некротизованої ділянки перериваються кісткові балки, за рахунок розвитку сполучної тканини, яка відділяє їх від живої кістки, може з'являтися смуга просвітління.

2.2.2. Гістологічний.

Для гістологічного дослідження фрагменти кісткової тканини вилучали, фіксували у 10 % розчині формаліну. Декальцинацію (4-5 діб) проводили 5 % водним розчином трихлороцтової кислоти з наступним промиванням у проточній воді (1 добу). Далі проводили дегідратацію у спиртах різної міцності (70 – 70 – 96 – 100 %) та у спирті з ефіром (розчин 1 : 1) по 3 доби в кожному розчині; з наступною заливкою у целоїдин [17].

Гістологічні зрізи виготовляли на санчастому мікротомі Reichert. Отримані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином [17].

Дослідження отриманих гістологічних препаратів та їх фотографування проводили за допомогою світлового мікроскопа «AxioStar Plus».

2.2.3. Біохімічні методи дослідження показників метаболізму кісткової тканини, маркерів ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів.

Біохімічні та імуноферментні дослідження проведені в сироватці крові, яку виділяли за стандартною методикою [74]. Сироватку отримували шляхом центрифугуванням крові при 600 g протягом 30 хв. за 18-22°C. Аліквоти сироватки крові відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення аналізу зберігали при -20°C.

Дослідження показників метаболізму кісткової тканини.

Вміст вільного та пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові визначали за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом [119]. *Вміст загального кальцію* в сироватці крові визначали уніфікованим спектрофотометричним методом за реакцією з о-крезолфталейн комплексом за набором «Кальцій» (Філісіт-Діагностика, Україна). *Вміст фосфатів* у сироватці крові визначали уніфікованим спектрофотометричним методом за реакцією з молібдатом амонію в кислому середовищі за набором «Фосфор VIS» (Філісіт-Діагностика, Україна). *Визначення активності кислої (КФ 3.1.3.2) та лужної фосфатаз (КФ 3.1.3.1)* у сироватці крові проводили спектрофотометричним методом за реакцією з п-нітрофенілфосфатом при рН 4,8 і 10,5 відповідно [60].

Дослідження маркерів ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів.

Визначення вмісту молекул середньої маси в сироватці крові. Рівень молекул середньої маси визначали після осадження білків трихлороцтовою кислотою (ТХО) [19]. До 0,6 мл сироватки додавали 0,3 мл 10 % ТХО, перемішували, інкубували протягом 5 хв. при -20°C, а далі центрифугували протягом 20 хв. при 1700g. До 0,5 мл супернатанту додавали 4,5 мл дистильованої води та вимірювали показник оптичної густини проб на спектрофотометрі при довжині хвилі 254 нм.

Визначення вмісту ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РП, вторинні продукти перекисного окиснення ліпідів) у сироватці крові проводили за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [15]. У центрифужні пробірки вносили по 2 мл дистильованої води, 1 мл сироватки (в контроль 1 мл дистильованої води), 2 мл 30% розчину ТХО. Проби центрифугують 5 хв при 1700 g, відбирають 3 мл надосадової рідини, додають 1,5 мл 0,8% розчину ТБК та кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв. Проби охолоджують і вимірюють оптичну щільність розчинів на спектрофотометрі при довжині хвилі 532 нм.

*Вміст карбонільних груп протеїнів (КГП) у сироватці крові визначали за утворенням фенілгідазонів, що мають характерний спектр поглинання, при взаємодії карбоксильних груп аліфатичних амінокислот із 2,4-динітрофенілгідазином [38]. До 0,1 мл сироватки крові додавали 0,5 мл 0,5N розчину HCl, 0,2 мл 0,2% розчину 2,4-динітрофенілгідазину на 0,8N розчині HCl. Суміш інкубували 10 хвилин при 20°C, потім осаджували білки 0,3 мл 10% розчину CCl_3COOH , центрифугували упродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. Осад білків двічі промивали 1,0 мл 5% розчину CCl_3COOH та центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. До осаду білків додавали 1 мл 0,9% розчину NaCl та 1 мл 5% розчину NaOH. Інкубували 20 хвилин за кімнатної температури. Фотометрували при 490 нм. Кількість карбонільних груп білків розраховували за калібрувальним графіком. *Активність анти-оксидантного ензиму супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) у сироватці крові визначали за інгібуванням окиснення кверцетину [49]. Активність прооксидантного ферменту НАДФН-оксидази (КФ 1.6.3.1) у сироватці крові визначали за падінням поглинання НАДФН при 340 нм [153]. Вміст білка в сироватці крові визначали мікробіуретовим методом [58]. Вміст нітратів та нітритів у сироватці крові визначали за реакцією з реактивом Гріса після осадження білків ацетонітрилом. Нітрати попередньо відновлювали до нітритів сумішшю цинкового порошку та розчину аміаку [54].**

2.2.4. Імуноферментні методи дослідження вмісту в сироватці крові прозапальних цитокінів та факторів росту.

Вміст фактору росту судинного ендотелію людини (VEGF) у сироватці крові визначали імуноферментним методом із використанням стандартного набору «VEGF ELISA» (Invitrogen, Канада) відповідно до інструкції фірми-виробника). У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до VEGF, вносили по 100 мкл стандартних розчинів, а в решту лунок – по 50 мкл буферного розчину та додавали по 50 мкл контрольних проб та проб сироватки крові, перемішували та інкубували 2 год. за 18-25°C. Лунки від-

мивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл біотинильованих антитіл та інкубували 1 год. за 18-25⁰С. Потім лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл ензимного кон'югату для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ-АТ_{біотинильоване} - АТ- ензим. Інкубували 30 хв. за 18-25⁰С. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл субстратного розчину, інкубували 30 хв. за 18-25⁰С, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний світлофільтр 630 нм).

Вміст фактору некрозу пухлини-альфа (ФНПа) в сироватці крові визначали імуноферментним методом із використанням комерційного набору «TNFα ELISA» («Diacclone», Франція) відповідно до інструкції фірми-виробника. У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до ФНПа, додавали по 100 мкл стандартних розчинів (із відомими концентраціями ФНПа), контрольних проб та проб сироватки крові, 50 мкл біотинолових антитіл. Інкубували 3 год. за 18-25⁰С. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл ензиму (стрептавідин-пероксидазу) та інкубували упродовж 30 хв. за 18-25⁰С для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ-АТ-ензим. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл ТМВ-субстрату (хромогену, який реагує зі зв'язаним на твердій фазі ензимом з утворенням забарвленої речовини), інкубували 15 хв. за 18-25⁰С, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр 630 нм).

Вміст інтерлейкіну-8 (ІЛ-8) у сироватці крові визначали імуноферментним методом із використанням стандартних наборів фірми «Diacclone»(Франція). У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до відповідних інтерлейкінів, додавали по 100 мкл стандартних розчинів (із відомими концентраціями цитокіну), контрольних проб, проб сироватки крові, а також 50 мкл біотинолових антитіл. Інкубували 60 або 120 хвилин (для визначення ІЛ-8 та ІЛ-10 відповідно) за 18-25⁰С. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл стреп-

тавідин-пероксидази та інкубували упродовж 30 хвилин за 18-25⁰С для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ-АТ- ензим. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл субстратного розчину, який реагує зі зв'язаним на твердій фазі ензимом з утворенням забарвленої речовини, інкубували 15 хв. за 18-25⁰С, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (дифренційний фільтр 630 нм).

Вміст трансформуючого фактору росту бета (ТФР-β1) у сироватці крові визначали імуноферментним методом із використанням стандартного набору «TGF-β1 ELISA kit» фірми «DRG», Франція (відповідно до інструкції фірми-виробника).

У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла ТФР-β1, додавали по 100 мкл стандартних розчинів (із відомими концентраціями ТФР-β1), контрольних проб та проб плазми кров (попередньо розведених 1:50). Інкубували 16 годин за 4 ⁰С. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл антиплазми, інкубували 2 год. за 18-25⁰С. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, додавали 100 мкл ензимного кон'югату (антимишиний біотин), інкубували 45 хв за 18-25⁰С. Вносили 100 мкл ензиму (стрептавідин-пероксидазу) та інкубували упродовж 45 хв. за 18-25⁰С для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ- АТ_{біотинилъоване} -АТ- ензим. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл ТМВ-субстрату, інкубували 15 хв. за 18-25⁰С, реакцію зупиняли 50 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (дифренційний фільтр 630 нм).

2.2.5. Метод математичної статистики.

Статистичну обробку результатів імуноферментних та біохімічних досліджень здійснено за допомогою ліцензійного пакету «STATISTICA 6.1» з використанням непараметричних методів оцінки [81].

Визначали правильність розподілення ознак згідно з кожним варіаційним рядом, середні значення за кожною ознакою, що вивчалася, та стандартні відхилення. Вірогідність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерію Мана-Уїтні. Для встановлення біохімічних чинників, які найбільше інтегровані в механізми репаративного остеогенезу, проведено кореляційний аналіз за Спірменом та множинний лінійний регресійний аналіз.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ НА РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ПРИ ВІДКРИТОМУ АНГУЛЯРНОМУ ПЕРЕЛОМІ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ

3.1. Рентгенографічні та гістологічні показники морфогенезу регенерату у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Перша серія, контрольна група. У даній серії наведені результати досліджень морфогенезу регенерату у тварин із моделлю відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу.

На сьому добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи (рис. 3.1) визначався косий перелом між 3-м і 4-м зубами. У кінцевих відділах уламків кістки нижньої щелепи спостерігали явища остеопорозу.

Контури ліній перелому частіше були не чіткими. У площині перелому прослідковували вузькі довгасті секвестри. У дистальних уламках кістки нижньої щелепи виявляли ділянки деструкції неправильної форми. Крім того, визначали деструктивні зміни в кортикальній пластинці ложа різця по його нижній поверхні, з явищами періоститу. Спостерігали різко виражену резорбцію альвеолярного відростка нижньої щелепи біля верхівки дистального кореня 4-го зуба, корені 3-го і 4-го зубів оголені наполовину, 2-го зуба – на чверть довжини.

На 14 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи щілина перелому розширена порівняно з попереднім терміном спостереження, утворює в кістці дефект довгастої форми з нерівними краями. У кінцевих відділах уламків нижньої щелепи явища остеопорозу більше виражені порівняно з попереднім терміном спостереження. У дистальному уламку кістки

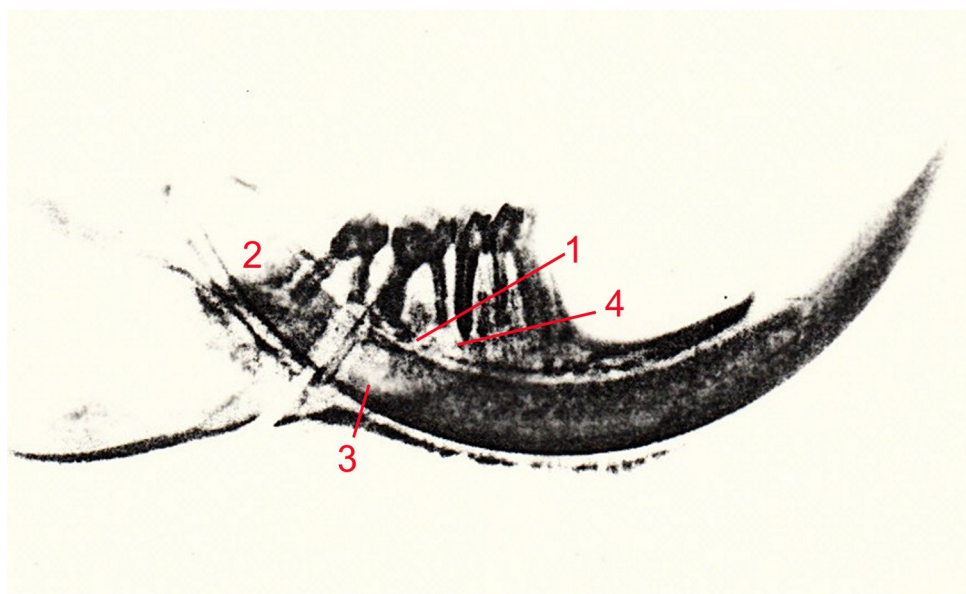


Рис. 3.1. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 7 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – косий перелом кута щелепи між 3-м і 4-м зубами; 2 – остеопороз у дистальному уламку нижньої щелепи; 3 – резорбція альвеолярного відростка; 4 – виражена періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця. Зб. 2.

нижньої щелепи поряд із цим визначали великі ділянки деструкції. Порівняно з попереднім терміном спостереження більш виражені деструктивні зміни в кортикальній пластинці по нижній поверхні ложа різця та періостальна реакція. Також на відміну від попереднього терміну спостереження нами була виявлена значна резорбція альвеолярного відростка: корені 3-го і 4-го зубів і дистальний корінь 2-го зуба були повністю оголені.

На 21 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи (рис. 3.2) в зоні перелому зафіксовані значні деструктивні зміни. У площині утвореного дефекту кістки розташовані довгастої форми секвестри з нерівними краями. Контури ділянок деструкції мають більш чіткі обриси за рахунок явищ остеосклерозу. Періостальна реакція по нижньому краю різця більш виражена порівняно з попереднім терміном спостереження. Корені 3-го і 4-го

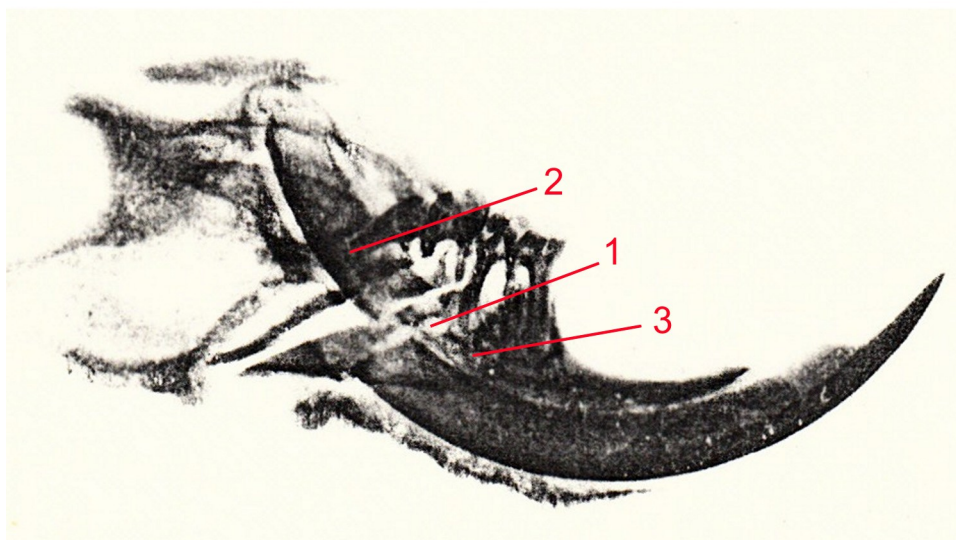


Рис. 3.2. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 21 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – у ділянці перелому секвестр довгастої форми з нерівними краями; 2 – відмежування ділянок деструкції за рахунок явищ остеосклерозу; 3 – виражена періостальна реакція по нижній ділянці кортикальної пластинки ложа різця. Зб. 2.

зубів були оголені повністю, а дистальний корінь 2-го зуба – на дві третини своєї довжини.

На 30 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи на краях уламків кістки остеопороз більш виражений порівняно з попереднім терміном спостереження. Явища остеопорозу відзначали і навколо ділянок деструкцій кісткової тканини. У нижніх відділах зони перелому, в ділянці дефекту кістки розташовані дрібні секвестри. Періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластини ложа різця була подібна до такої в попередній термін спостереження. В альвеолярному відростку також відзначали остеопороз. Корені 4-го зуба оголені повністю, корені 3-го зуба – три чверті, а корені 2-го зуба – на одну третину своєї довжини.

На 45 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи (рис. 3.3) виявляли дефект кісткової тканини на краях уламків.

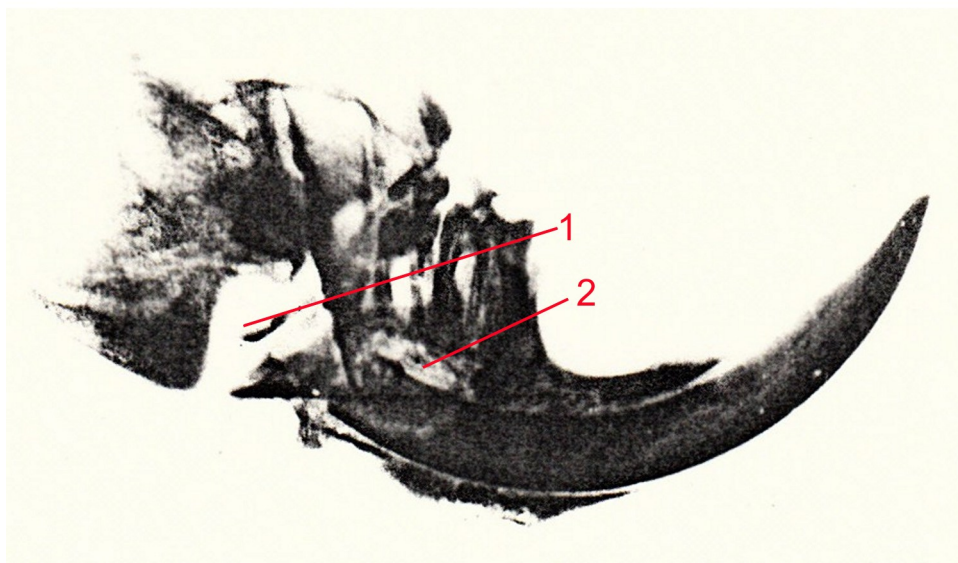


Рис. 3.3. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 45 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – великий дефект кістки з повними чіткими краями та наявністю довгастих секвестрів малої порожнини; 2 – періостальна реакція по нижньому краю ложа різця. 3б. 2.

В ділянці перелому визначали довгасті секвестри малої щільності з нечіткими краями. Краї дефекту фрагментів кістки рівні, щільні за рахунок прогресуючого остеопорозу. Періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця помірно виражена.

Істотних змін структури альвеолярного відростка порівняно з попереднім терміном спостереження не виявлено.

Мікроскопічно на 7 добу на гістограмах (рис. 3.4) виявлені великі ділянки некрозу та секвестрації фрагментів пластинчастої кісткової тканини і зубів, оточені вузькими ділянками грануляційної тканини, інтенсивно інфільтрованої лейкоцитами на межі з пухкою волокнистою сполучною тканиною слизової оболонки ясен.

На окремих ділянках спостерігали виражену лакуарну резорбцію фрагментів кісткової тканини, а також наявність грануляційної тканини, вогнищево і дифузно інфільтрованої лейкоцитами.

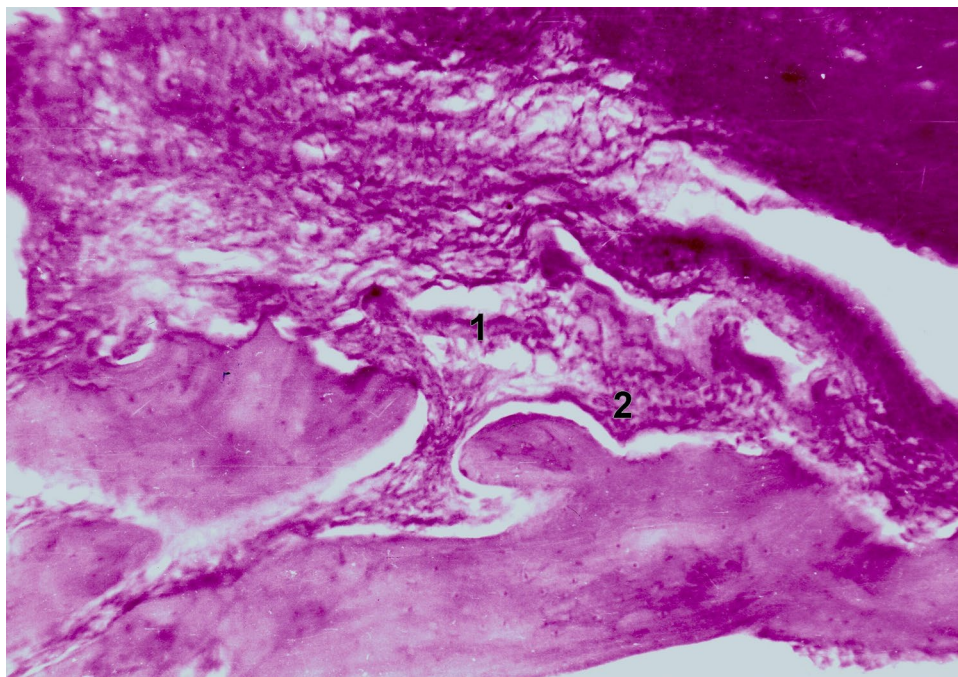


Рис. 3.4. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 7 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – лакунарна резорбція фрагментів кістки; 2 – грануляційна тканина, вогнищево інфільтрована лейкоцитами. Контроль. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

Великі поля некрозу (рис. 3.5) відокремлені від фрагментів пластинчастої кісткової тканини, що піддаються лакунарній резорбції, інтенсивно інфільтрованим лейкоцитами грануляційним валом.

На 14 добу на гістограмах (рис. 3.6) визначали хаотично розташовані ділянки некрозу, секвестрації, які частково оточені прошарками грануляційної тканини, інфільтрованої лейкоцитами, а місцями чергувалися з полями неправильної форми з вузькопетлистою мережі кісткових балочок.

На окремих ділянках визначали секвестри пластинчастої кісткової тканини, розташованої серед полів некрозу пластинчастої кісткової тканини або на межі некрозу і грануляційної тканини, інфільтрованої лейкоцитами.

Ділянки новоутвореної кісткової тканини (рис. 3.7) розташовані в товщі грануляційної тканини, що розділяє поле некрозу. Між пластинками кісткової тканини розташована добре васкуляризована щільна волокниста

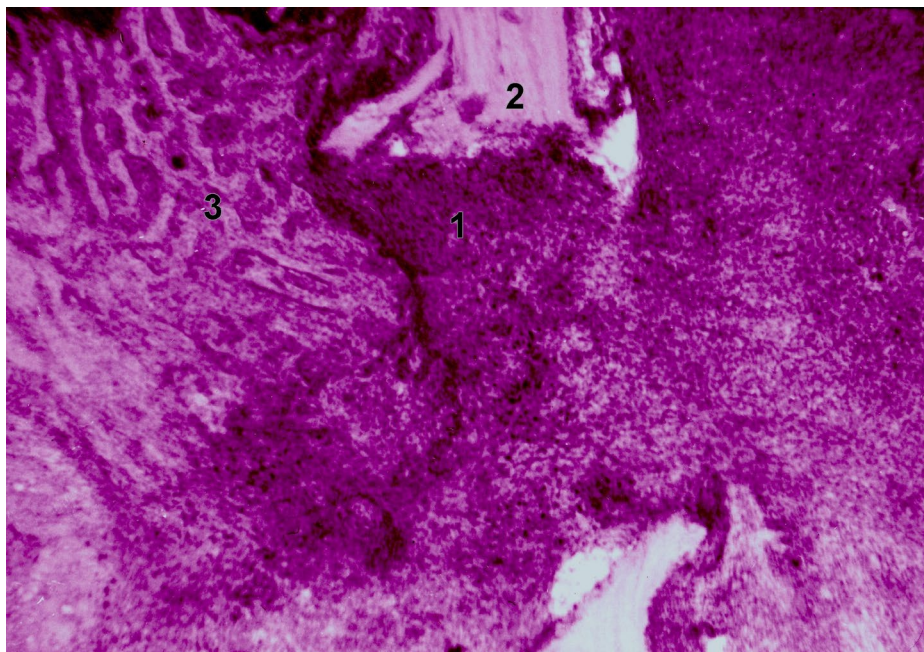


Рис. 3.5. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 7 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – грануляційна тканина зі смугою інфільтрації; 2 – ділянки некрозу та секвестрації; 3 – поля новоутворених кісткових пластин. Контроль. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

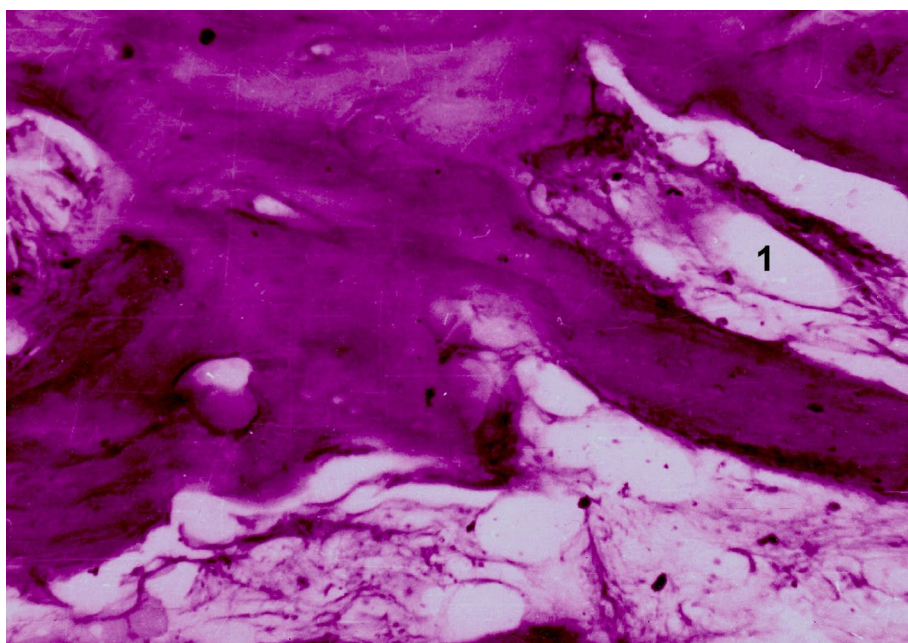


Рис. 3.6. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 14 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – секвестри з пластинчастої кісткової тканини та поля некрозу, оточені інфільтрованою лейкоцитами грануляційною тканиною. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

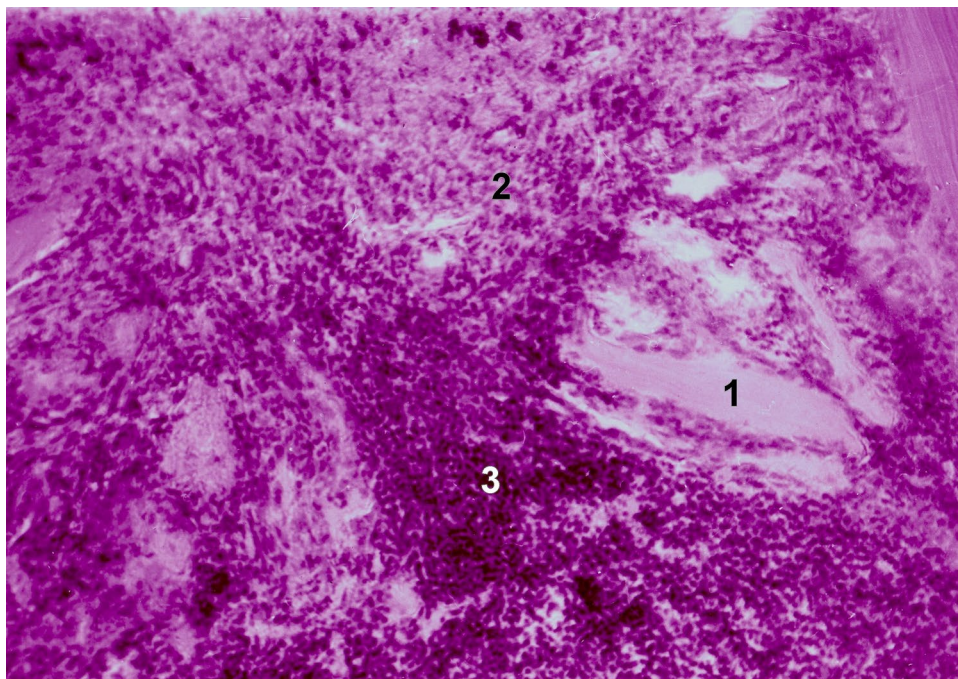


Рис. 3.7. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 14 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – мережа орієнтованих новоутворених пластин кісткової тканини; 2 – грануляційна тканина; 3 – ділянки некрозу. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

сполучна тканина. Лейкоцитарна інфільтрація найбільш виражена на межі некрозу і грануляційної тканини (рис. 3.8).

На 21 добу на гістограмах (рис. 3.9) серед великих ділянок некрозу пластинчастої кісткової тканини розташовані різної величини секвестри, оточені ділянками грануляційної тканини, лейкоцитарна інфільтрація в якій більш виражена на межі з ділянками некрозу. Мікроскопічно на окремих кінцях фрагментів пластинчастої кістки виявляли лакуарну резорбцію. Ділянки з нашаруваннями новоутвореної кісткової тканини були розташовані по періостальній і ендостальній поверхнях.

Найбільш виражену лейкоцитарну інфільтрацію виявили на ділянках грануляційної тканини, яка обмежує поширення зон некрозу.

На 30 добу на гістограмах визначали хаотично розміщені ділянки некрозу, з секвестрами різної величини і грануляційної тканини, місцями з інтенсивно вираженою інфільтрацією. Новоутворена кісткова тканина була

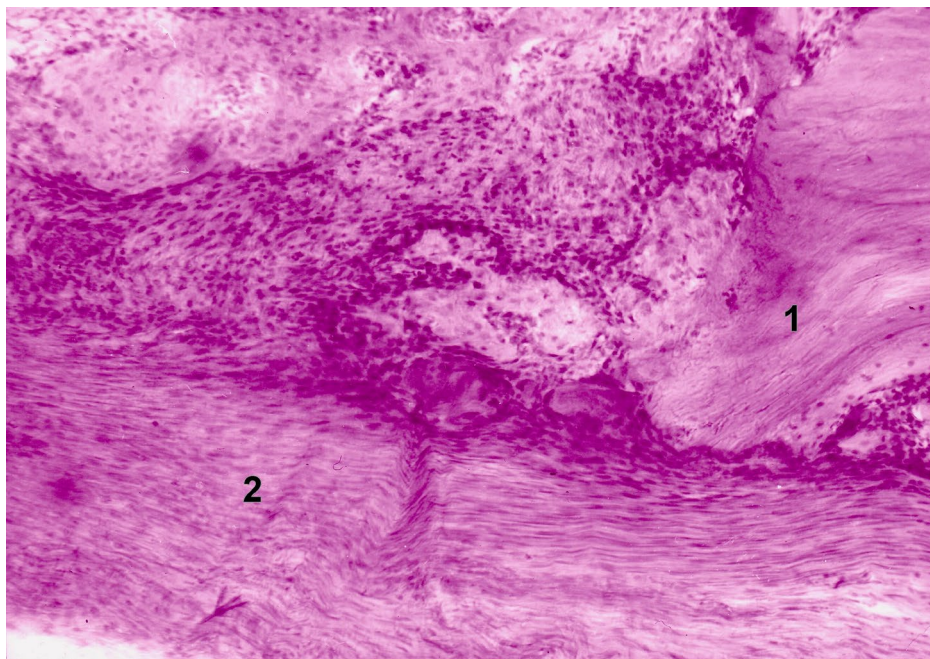


Рис. 3.8. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 14 добу після відкритого перелому на тлі остеопорозу: 1 – фрагменти з пластинчастої кісткової тканини з нашаруваннями новоутвореної кістки; 2 – грануляційна тканина з пучками колагенових волокон. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

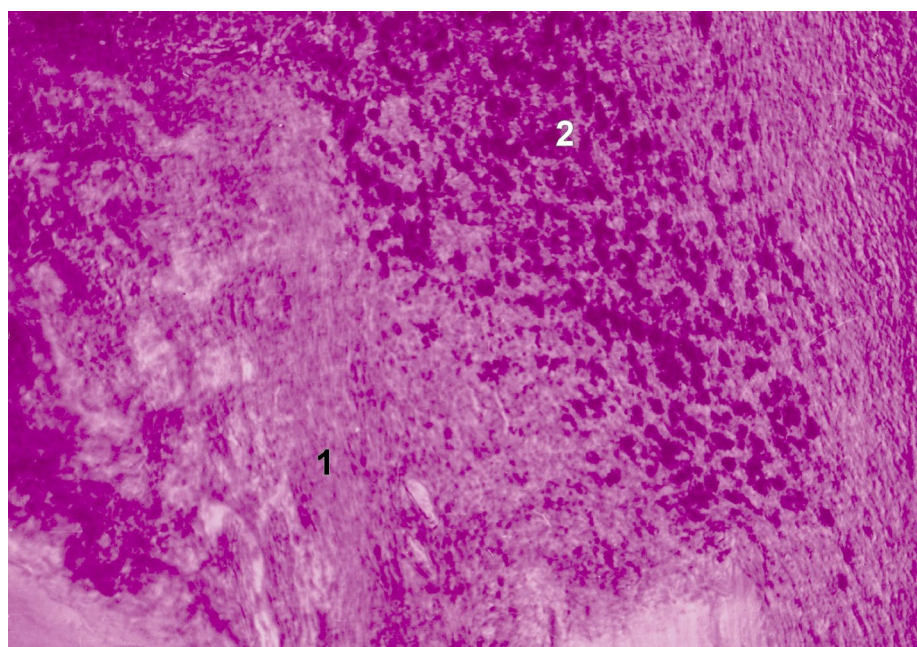


Рис. 3.9. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 21 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – поля грануляційної тканини; 2 – інфільтровані лейкоцитами ділянки некрозу. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

переважно на периферії.

Мікроскопічно на окремих ділянках (рис. 3.10) виявили виражену лакунарну резорбцію і осередки остеогенезу на поверхні фрагментів, відмежованих від ділянок некрозу грануляційним валом, інтенсивно інфільтрованим лейкоцитами.

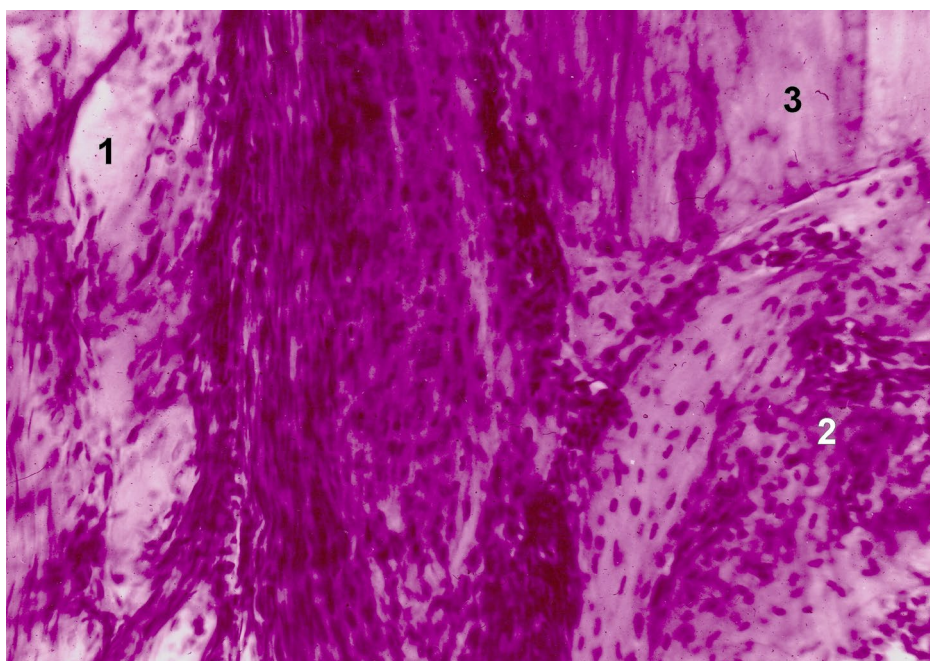


Рис. 3.10. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 30 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – лакунарна резорбція; 2 – осередки остеогенезу; 3 – фрагменти пластинчастої кісткової тканини. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

У більшості полів зору (рис. 3.11) виявляли хаотично розміщені ділянки некрозу, секвестри і дрібнопетлисту мережу новоутворених кісткових пластинок, оточених грануляційною тканиною. Частина кісткових пластинок була безостеоцитними типовими секвестрами, інша частина мала з'їдені контури і була подібна до секвестрів, але містила добре забарвлені остеоцити. Остеоцити, що знаходяться на поверхні кісткових пластинок, оточені лакунами з нечіткими контурами, мали великі, базофільно забарвлені ядра. Окремі остеоцити були невеликого розміру, містили щільні ядра та перебували в розширених лакунах з базофільними краями, що свідчило про по-

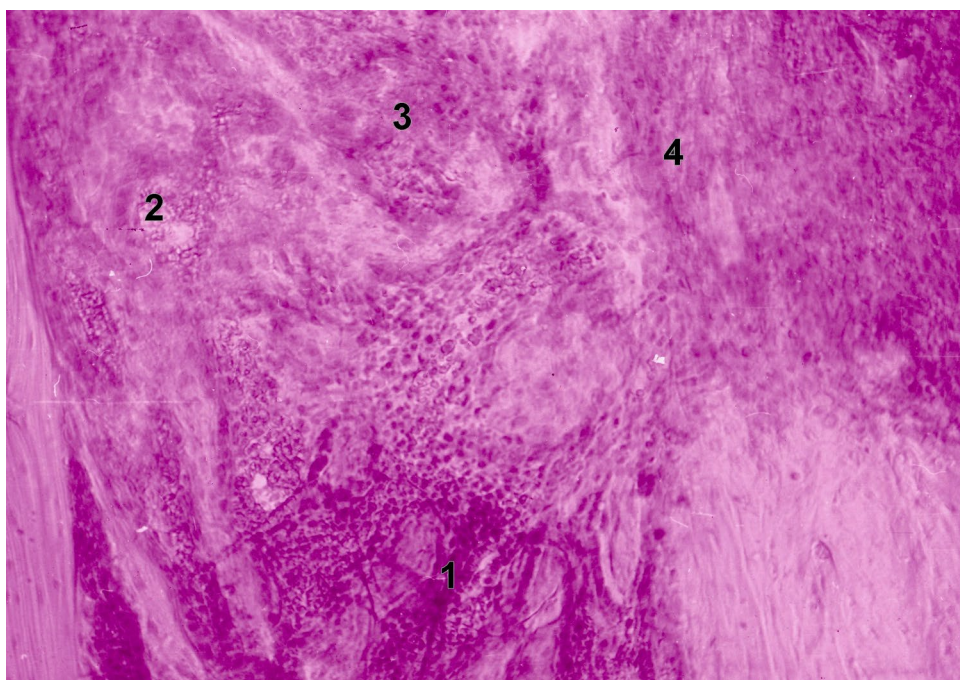


Рис. 3.11. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 30 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – ділянки некрозу; 2 – секвестри; 3 – дрібнопетлиста мережа новоутворених кісткових пластин; 4 – грануляційна тканина. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

рушення мінералізації і кальцифікації стінок лакун. Описані зміни кісткової тканини можна оцінювати як остеопороз.

На 45 добу на гістограмах осередки секвстрації та некрозу займають переважно центральні ділянки. Вони відокремлені вузькою зоною інфільтрованої по краю грануляційної тканини, яка в деяких випадках обмежує норицеві ходи через м'яз і шкіру. Поля новоутвореної кісткової тканини, виявлені за межами грануляції, формують несучільну вторинну кісткову тканину.

На окремих ділянках (рис. 3.12) визначено нашарування новоутвореної кісткової тканини на фрагменти пластинчастої кісткової тканини, які оточені рубцевою сполучною тканиною.

У низці місць секвестри (рис. 3.13) частково зрощені з кістковими пластинками новоутвореної дрібнопетлистої мережі, тоді як в інших полях зору пластинки новоутвореної кісткової тканини обмежені інфільтрованою

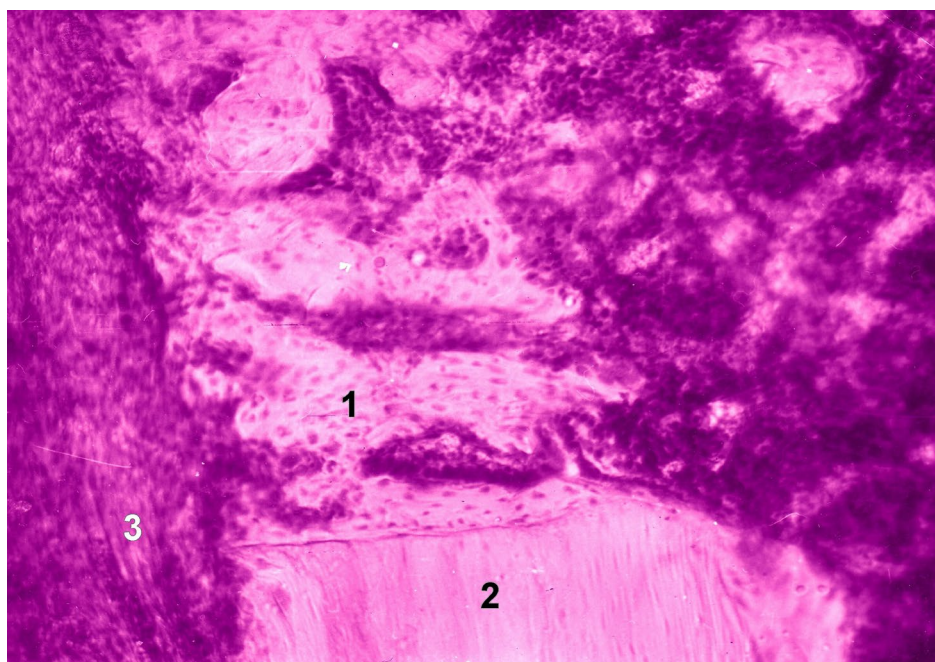


Рис. 3.12. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 45 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – нашарування новоутвореної кісткової тканини; 2 – фрагмент пластинчастої кісткової тканини; 3 – рубцева сполучна тканина. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

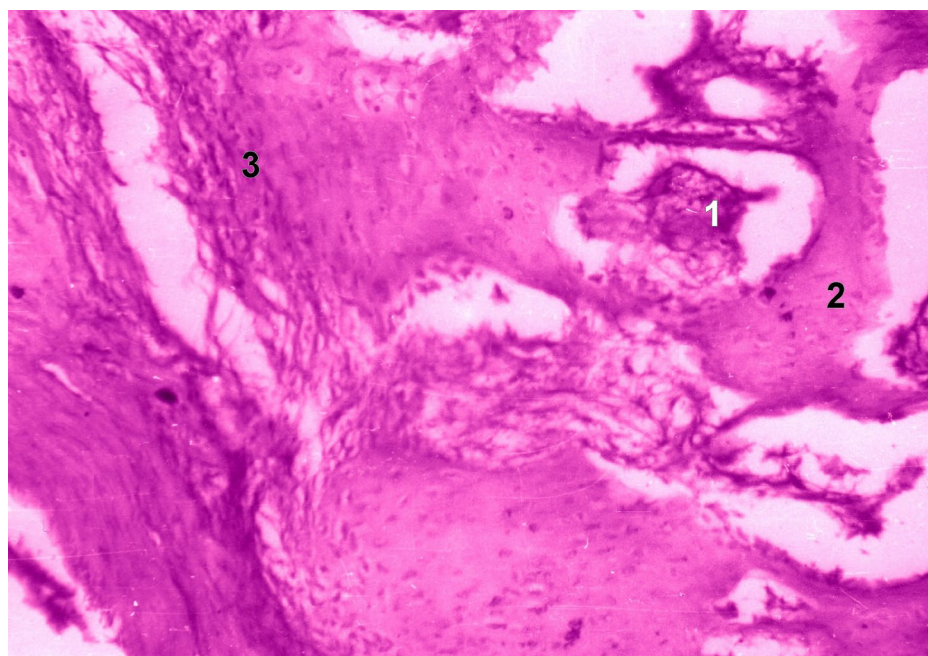


Рис. 3.13. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа на 45 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу: 1 – секвестровані фрагменти пластинчастої кісткової тканини; 2 – мережа новоутворених кісткових пластинок; 3 – грануляційна тканина, інфільтрована лейкоцитами. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

лейкоцитами грануляційною тканиною. Також виявлено кісткові пластинки в центральних відділах, де серед пластинчастої кісткової тканини розміщені осередки грубоволокнистої кісткової тканини. У кісткових пластинках виявляли мікротріщини, а також ділянки базофільного матриксу, що відображає порушення процесів мінералізації. Щільність розташування остеоцитів була високою, проте для них був характерний нерівномірний розподіл у матриксі та варіабельність їхніх розмірів. Всі ці зміни можна розцінювати як остеопоротичні.

Таким чином, у першій групі тварин регенерація пошкодженої нижньої щелепи супроводжувалася вираженими процесами некрозу і секвестрації. Поряд із первинним некрозом спостерігалися явища вторинного некрозу, в результаті чого вогнища некрозу в зонах пошкодження на 7 добу експерименту становили майже половину полів зору. У наступні терміни спостереження обсяг некротичних змін і секвестрації поступово зменшувалася до 45 доби експерименту.

Другою закономірністю цього процесу була виражена інфільтрація тканин, яка також послідовно наростала з 14 до 21 доби і зменшувалася до 45 доби експерименту. Незважаючи на значний обсяг некротичних змін, секвестрації та інфільтрації лейкоцитами, грануляційна тканина, що формується, до 45 доби повністю відмежовувала зони некрозу і секвестрації, а за її межами формувалася вторинна кісткова тканина з дрібно- і крупнопетлистої мережі новоутворених кісткових пластинок.

Третьою закономірністю регенераційного процесу в досліджуваній групі був процес остеопорузу правої половини нижньої щелепи на краях уламків, а також навколо ділянок деструкцій, особливо виражений з 21 по 30 добу, і зберігався до 45 доби.

Таким чином, грануляційна тканина була найбільш активним компонентом регенерату в усі терміни його формування і відмежовувала поля лейкоцитарної інфільтрації та секвестри, але остеогенний компонент не отримав переважного розвитку, і отже, за даної моделі пошкодження на 45

добу відновлення цілісності нижньої щелепи не відбувалося, тобто в морфогенезі регенерату була відсутньою закономірна зміна структури, що уповільнювало процес перебудови.

3.2. Рентгенологічні та гістологічні показники морфогенезу регенерату у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти

У даній серії представлені результати досліджень морфогенезу регенерації у тварин із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти.

На 7 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи (рис 3.14) виявляли косий перелом між 3-м і 4-м зубами.

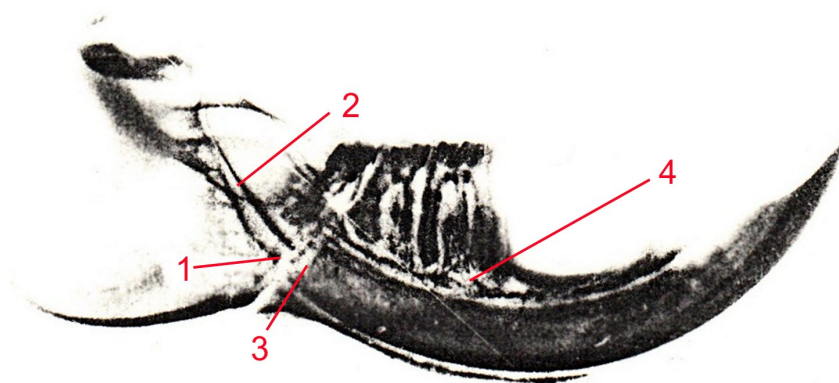


Рис. 3.14. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 7 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти: 1 – косий перелом тіла щелепи між 3-м і 4-м зубами; 2 – явища остеопорозу в кінцевих відділах уламків; 3 – чітко відмежовані ділянки резорбції альвеолярного відростка; 4 – слабка періостальна реакція по нижньому краю ложа різця. Зб. 2.

Контури щілини перелому не рівні, але чіткі. У кінцевих відділах уламків виражені явища остеопорозу. У дистальному уламку розрідження кісткової тканини виражено слабше. По нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця виявляли розрідження кістки і слабо виражену періостальну реакцію.

Ділянки резорбції альвеолярного відростка були чітко обмежені. Корені 3-го і 4-го зубів оголені на половину своєї довжини. Корінь 4-го зуба – резорбований.

На 14 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи виявляли деструктивні зміни в дистальному уламку з явищами остеопорозу навколо вогнища деструкції. Контури уламків нерівні, але більш чіткі порівняно з попереднім терміном спостереження. У щілині перелому визначали дрібні секвестри. По нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця виявляли явища остеопорозу з незначною періостальною реакцією, більш вираженою в дистальному уламку. Прояви резорбції альвеолярного відростка в ділянці 3-го і 4-го зубів були більш виражені, ніж такі ж в попередньому терміні спостереження.

На 21 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи (рис. 3.15) у дистальному уламку виявляли чітко обмежені ділянки деструкції. Контури медіального уламку нижньої щелепи нечіткі, а дистального – чіткі, але нерівні. У дистальному уламку нижньої щелепи біля зони перелому формується порожнина з чітко відмежованими секвестрами довгастої форми. Ділянки резорбції альвеолярного відростка також чітко обмежені. Корені 3-го і 4-го зубів оголені повністю. Періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця слабо виражена.

На 30 добу на рентгенограмах правої половини нижньої щелепи виявляли щілину між медіальним і дистальним уламками нижньої щелепи. Краї щілини чіткі за рахунок вираженого остеосклерозу кінцевих відділів уламків. Секвестрів у щілині немає. Виявлена виражена періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця. Корені 3-го і 4-го зубів

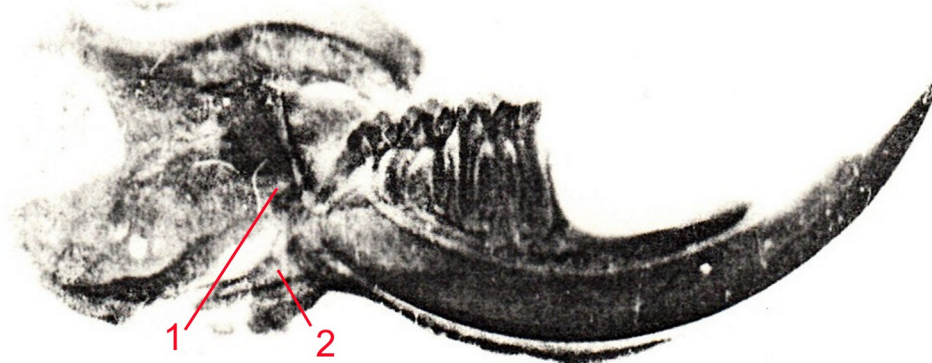


Рис. 3.15. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 21 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти: 1 – чітко відмежовані ділянки деструкції в дистальному уламку щелепи; 2 – порожнина в кістці в ділянці перелому з наявністю відмежованих секвестрів довгуватої форми.

оголені повністю, а корінь 2-го зуба – на дві третини своєї довжини.

На 45 добу на рентгенограмах нижньої щелепи справа (рис. 3.16) виявляли чіткі нерівні контури уламків з явищами вираженого остеосклерозу в кінцевих відділах. Ширина щілини між медіальним і дистальним уламками нижньої щелепи була меншою, переважно у верхніх відділах, порівняно з такою ж у попередній термін спостереження. Періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця помірна. Резорбцію альвеолярного відростка виявляли тільки в ділянці 4-го зуба.

Мікроскопічно на 7 добу на гістограмах (рис. 3.17) виявляли великі ділянки некрозу і секвестри, поширені на значній відстані від лінії пошкодження, але обмежені добре сформованою грануляційною тканиною з вузькими ділянками лейкоцитарної інфільтрації.

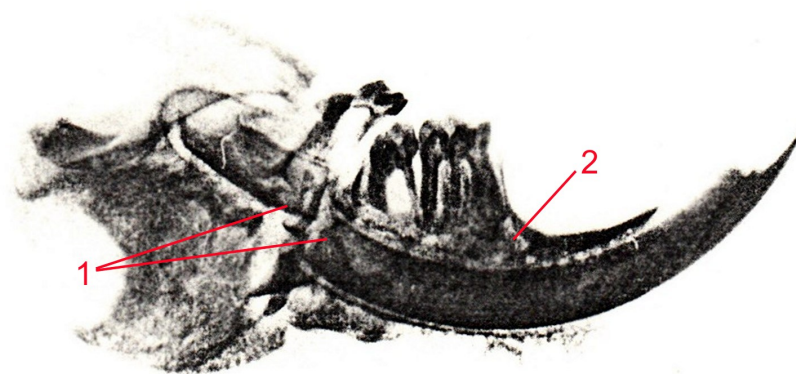


Рис. 3.16. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 45 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти: 1 – виражені явища остеосклерозу в кінцевих відділах уламків щелепи; 2 – помірна періостальна реакція по нижньому краю ложа різця. Зб. 2.

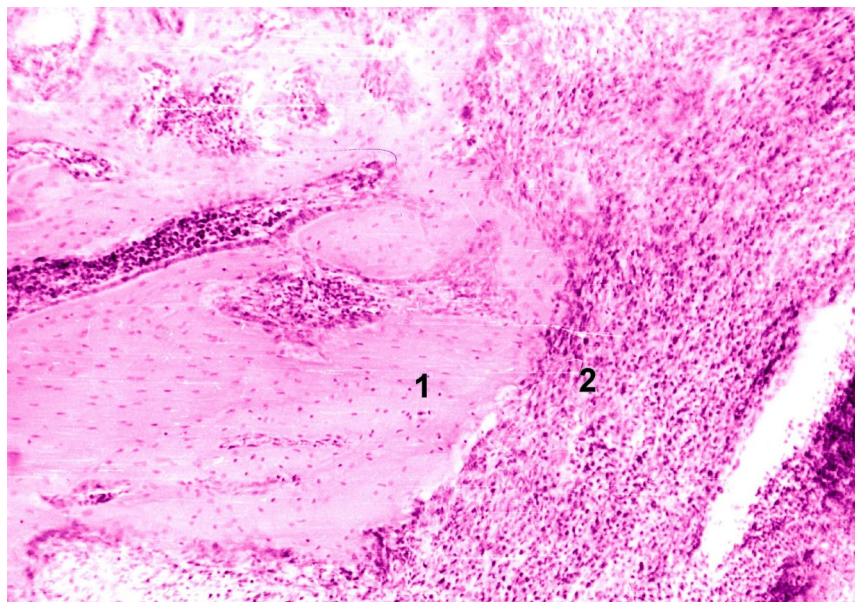


Рис. 3.17. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи щури з моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 7 добу після перелому: 1 – кінці фрагментів пластинчастої кістки; 2 – новоутворена кісткова тканина зі слабко вираженою лейкоцитарною інфільтрацією. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

На окремих ділянках (рис. 3.18) виявлені фрагменти компактної кісткової тканини, в яких поряд із чітко пофарбованими остеоцитами виявляли порожні лакуни або лакуни з асиметрично розташованими чи частково фрагментованими остеоцитами. Поверхня кісткових фрагментів із великою кількістю лакун резорбції в багатьох ділянках зрощена з новоутвореними кістковими пластинками, які місцями формують поля або переходять у ділянки остеогенної грануляційної тканини. У складі останньої виявлено значну кількість клітин з асиметрично розташованим ядром, інтенсивно оксифільною гомогенною цитоплазмою, що дозволяє віднести їх до преостеобластів. Часто між цими клітинами виявляли тонкі розгалужені ділянки новоутвореного кісткового матриксу.

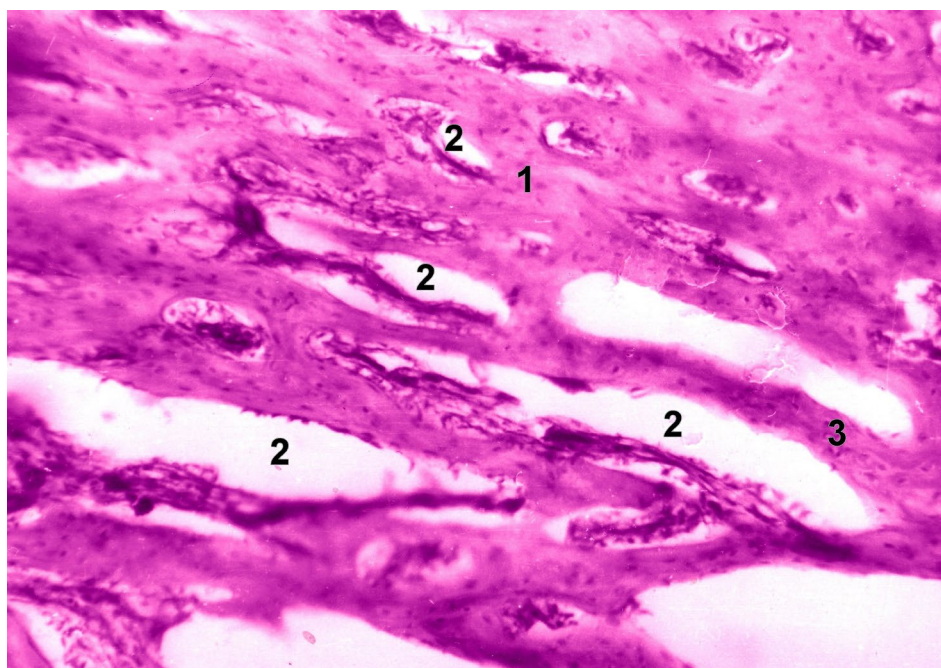


Рис. 3.18. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 7 добу після перелому: 1 – поверхня фрагменту пластинчастої кістки; 2 – ділянки лакунарної резорбції; 3 – мережа новоутворених кісткових пластин. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

На 14 добу на гістограмах (рис. 3.19) у складі компонентів регенерату

переважали поля грануляційної і новоутвореної кісткових тканин. Ділянки некрозу і секвестри чітко обмежені грануляційною тканиною, яка тільки в окремих місцях інфільтрована лейкоцитами у вигляді вузьких зон.

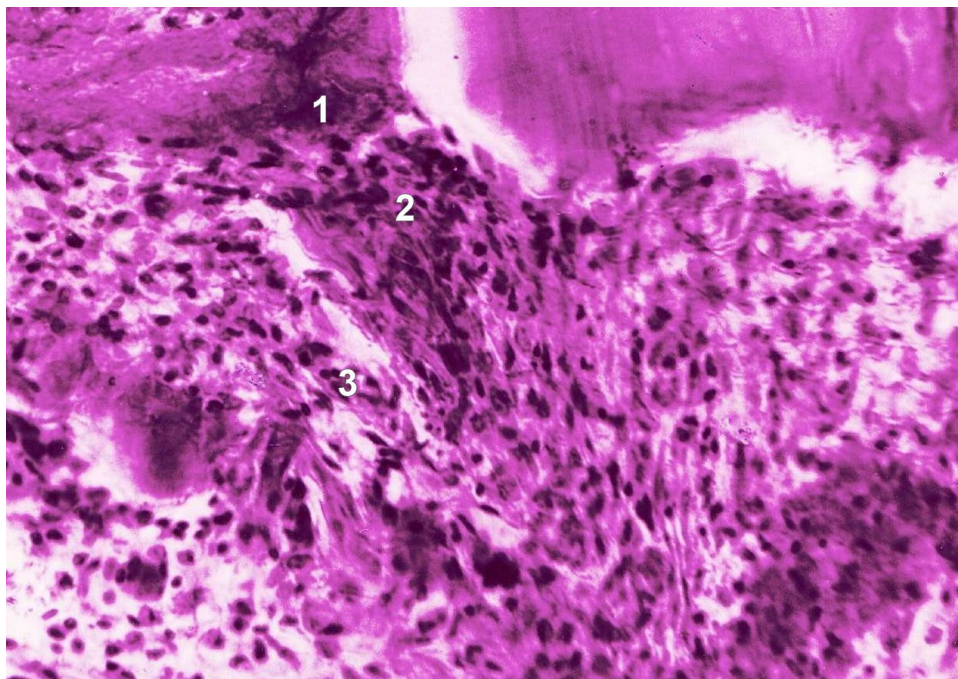


Рис. 3.19. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 14 добу після перелому: 1 – кінці фрагмента кісткової тканини; 2 – мережа новоутворених кісткових пластин; 3 – помірно васкуляризована грануляційна тканина. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

В окремих осередках (рис. 3.20) ділянки некрозу обмежені грануляційною тканиною, що містить велику кількість капілярів.

На тлі великої кількості новоутворених кісткових пластинок, переважно спаяних із поверхнею медіальними та дистальними фрагментами перелому нижньої щелепи, виявляли осередки компактної кісткової тканини без остеоцитів і з проявами лакунарної резорбції.

На 21 добу на гістограмах виявляли ділянки некрозу і секвестри. Вони займали центральні зони регенерату і були обмежені добре сформованою грануляційною тканиною, яка в місцях контакту із ділянками некрозу була

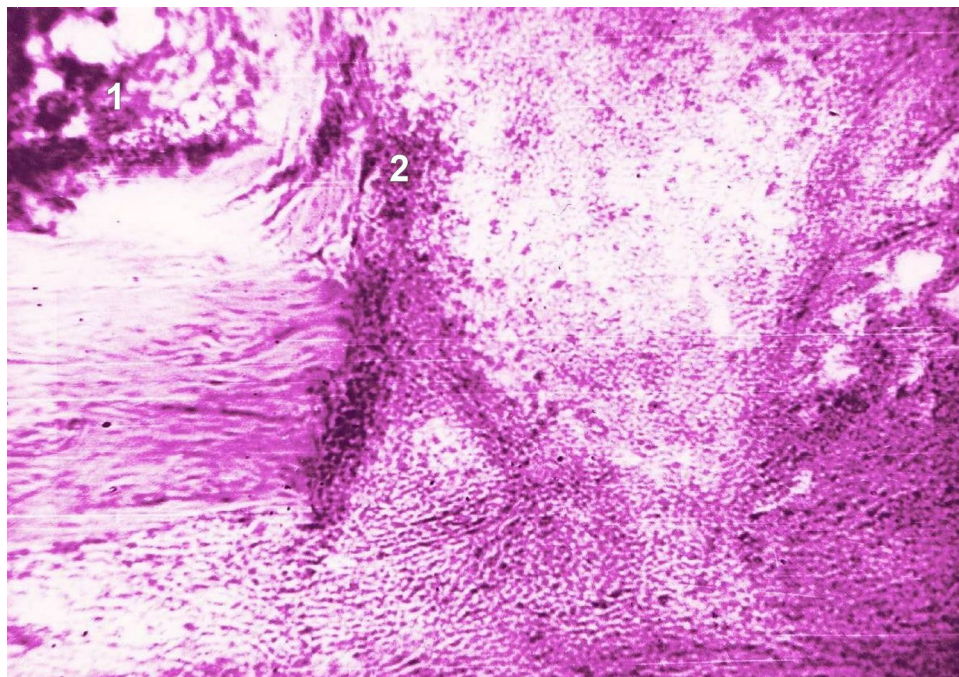


Рис. 3.20. Фрагменти відламків кісток нижньої щелепи справа у щурів з моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 14 добу після перелому: 1 – ділянки некрозу; 2 – грануляційна тканина зі слабо вираженою інфільтрацією. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

інфільтрована лейкоцитами. Поряд з пошкодженими відділами медіальних і дистальних фрагментів нижньої щелепи розташовані поля дрібно- та крупнопетлистої мережі кісткових пластинок (рис. 3.21).

В окремих полях зору (рис. 3.22) виявляли грануляційну тканину, яка обмежує сітководні поля новоутворених кісткових пластинок. Останні містять на своїй поверхні велику кількість остеокластів, що вказує на процес утворення пластинчастої кісткової тканини.

В інших ділянках виявили формування кортикальної структури з потовщених кісткових пластинок, відмежованої фіброзним шаром від грануляційної тканини.

На 30 добу на гістограмах (рис. 3.23) зберігалося описане розташування компонентів регенерату: ділянки некрозу і дрібні секвестри в центрі, порівняно вузька зона грануляційної тканини, що оточує ці ділянки, лише в

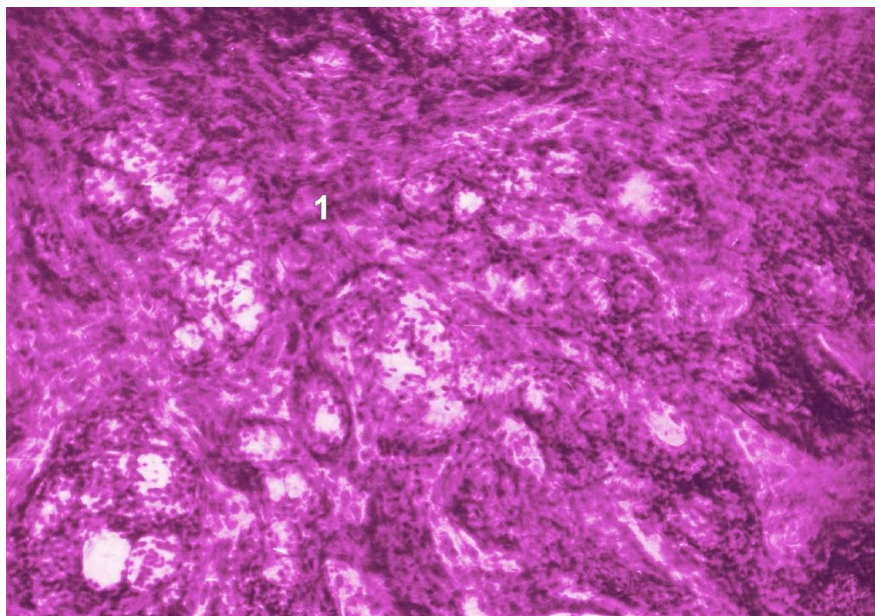


Рис. 3.21. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 21 добу після перелому: 1 – ділянки новоутвореної кісткової тканини з великою кількістю остеокластів на поверхні кісткових балочок. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

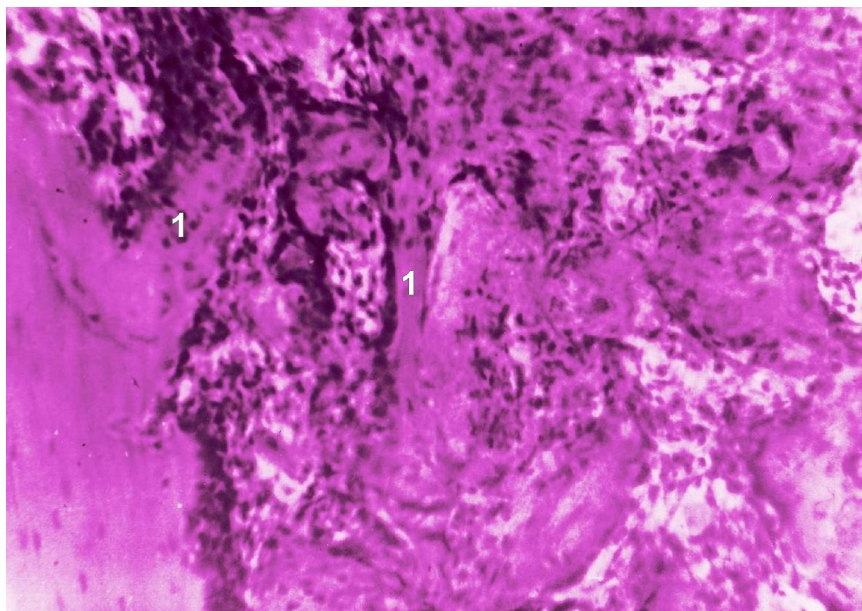


Рис. 3.22. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 21 добу після перелому: 1 – частково орієнтовані кісткові пластинки у складі мережі новоутворених структур. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

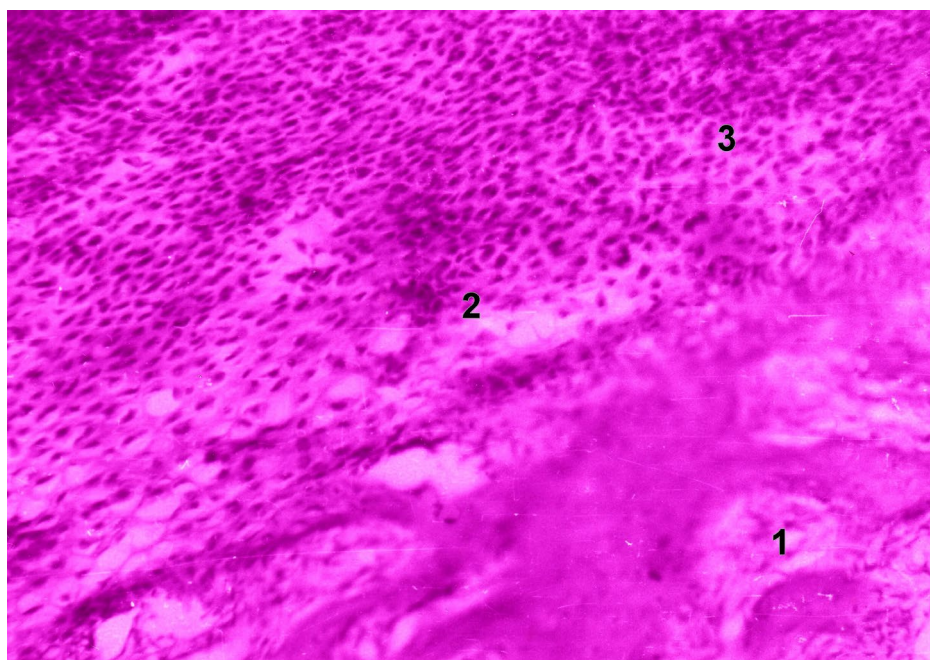


Рис. 3.23. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорузу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 30 добу після перелому: 1 – лакуарна резорбція кінця фрагменту пластинчастої кістки; 2 – грануляційна тканина зі слабо вираженою лейкоцитарною інфільтрацією. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

окремих осередках виявлена лейкоцитарна інфільтрація грануляційної тканини. Основним компонентом регенерату є новоутворена кісткова тканина, яка тісно зрощена зі збереженими фрагментами кісткової тканини.

У однієї тварини визначено добре сформований норицевий хід. В окремих місцях зафіксовано остеокластичну резорбцію компактної кістки на кінцях фрагментів і зрощення новоутвореної кісткової тканини з поверхнею цих же фрагментів. Поля новоутворених кісткових пластинок оточені грануляційною тканиною, яка в шарах, прилеглих до ділянки некрозу, інфільтрована лейкоцитами. Кінці фрагментів зрощені новоутвореними кістковими пластинками, але місцями їх розділяє грануляційна тканина з великою кількістю колагенових волокон (рис. 3.24).

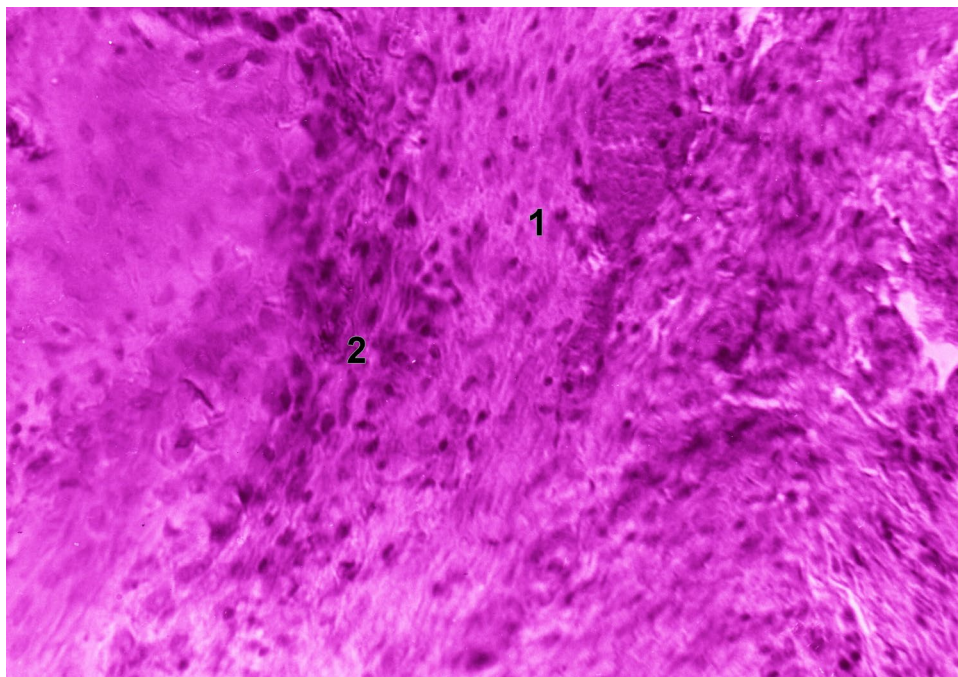


Рис. 3.24. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопору після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 30 добу після перелому: 1 – мережа кісткових пластинок; 2 – грануляційна тканина з пучками колагенових волокон. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

На 45 добу на гістограмах зберігається картина, описана вище (на 30 добу). Розташування основних компонентів регенерату у окремих тварин не мало істотних відмінностей. Більша частина полів складається з потовщених новоутворених кісткових пластинок, які формують крупнопетлисту мережу, тісно поєднану з компактною кістковою тканиною.

На деяких ділянках (рис. 3.25) чітко виявлено розмежування полів новоутворених кісткових пластинок і грануляційної тканини, яка вузькою зоною відокремлює ділянку некрозу. Збережені фрагменти компактної кістки (рис. 3.26) тісно з'єднані з новоутвореною кістковою тканиною. У зоні кінців медіального і дистального фрагментів нижньої щелепи виявлено лакунарну резорбцію.

Таким чином, у другій серії інтенсивність некротичних змін значно менше виражена, ніж у першій серії, а також спостерігається швидке відме-

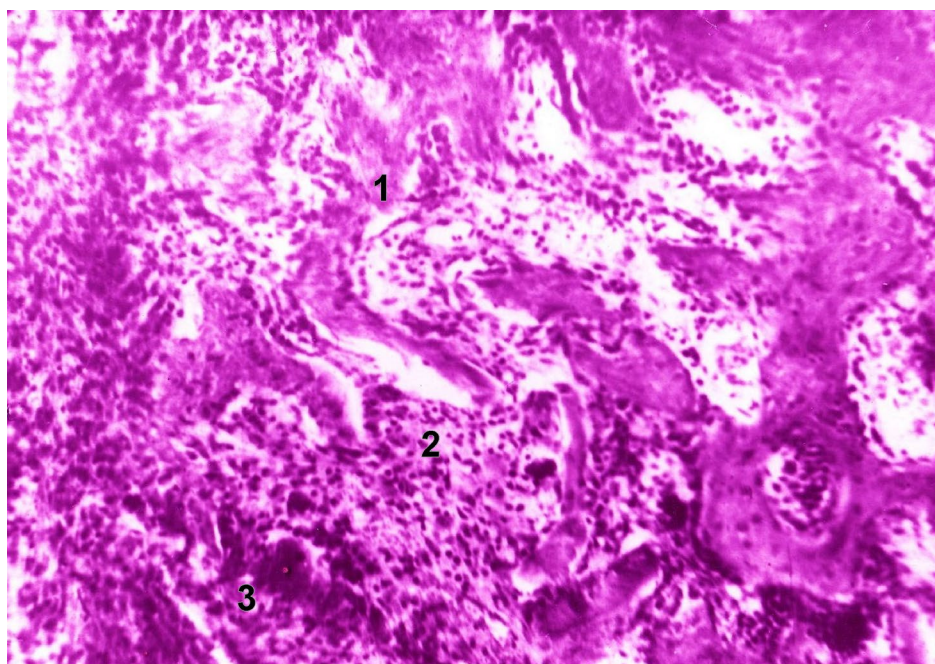


Рис. 3.25. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 45 добу після перелому: 1 – новоутворені кісткові пластинки; 2 – вузька зона грануляційної тканини; 3 – ділянка некрозу. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

жування ділянок некрозу та секвестрів і більш інтенсивний розвиток грануляційної тканини. Це створювало умови для зрощення фрагментів до 30-ї доби за рахунок дрібнопетлистої мережі новоутворених кісткових пластинок.

Наведені дані засвідчують активність остеогенного компонента при зрощенні фрагментів ушкодженої кістки за рахунок мережі дрібнопетлих кісткових балочок до 30 доби. Крім того, констатуємо виразну стимулюючу дію кріоконсервованої тканини плаценти, виражену більшою мірою на пізніх стадіях регенерації. Вона виявлена збільшенням площі новоутвореної кісткової тканини в зоні ушкодження порівняно з контрольною групою. Крім того, у частини тварин кріоконсервована тканина плаценти людини мала стимулюючий вплив на формування провізорних тканин на окремих ділянках регенерату з 14 по 21 добу.

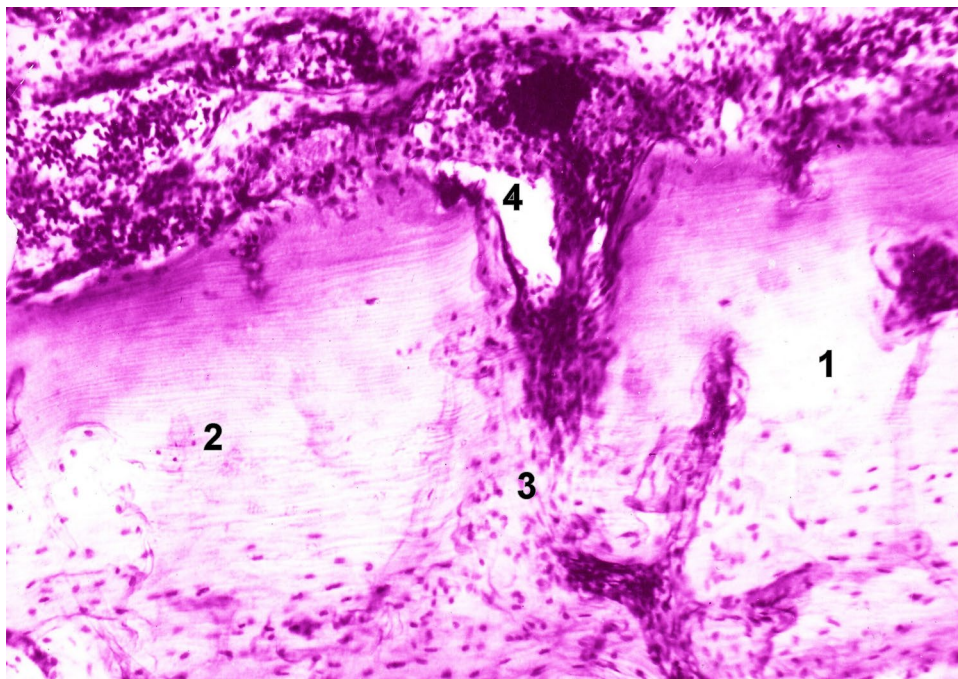


Рис. 3.26. Фрагменти уламків кісток нижньої щелепи справа у щурів із моделлю відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти на 45 добу після перелому: 1 – медіальний фрагмент компактної кісткової тканини; 2 – дистальний фрагмент компактної кісткової тканини; 3 – новоутворена кісткова тканина; 4 – лакуарна резорбція в ділянці кінців фрагментів. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

3.3. Рентгенологічні і гістологічні показники морфогенезу регенерату у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу, які отримували кальцій цитрат після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти

У цій серії наведені дані морфогенезу регенерату у тварин із моделлю перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу, які отримували кальцій цитрат після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти.

На 7 добу на рентгенограмах нижньої щелепи справа (рис. 3.27) визначався косий перелом між 3-м і 4-м зубами.

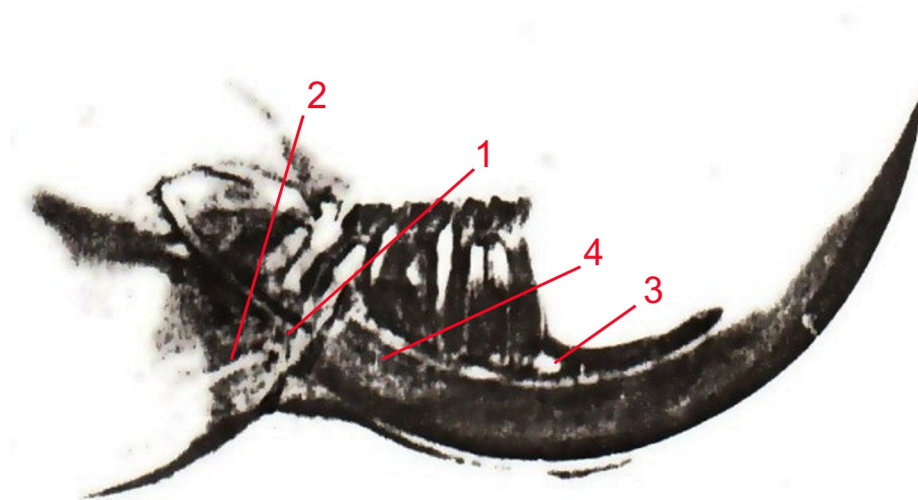


Рис. 3.27. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 7 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти та введення кальцію цитрат: 1 – косий перелом тіла щелепи між 3-м і 4-м зубами; 2 – остеосклероз у кінцевих відділах уламків; 3 – слабо виражена періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця; 4 – резорбція альвеолярного відростка в ділянці 4-го зуба. Зб. 2.

Контури щілини перелому рівні й чіткі з боку дистального уламка. У кінцевих відділах відламків виявлені явища остеосклерозу. Періостальна реакція по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця слабо виражена. Зафіксовано деструктивні зміни і резорбцію альвеолярного відростка в ділянці коренів 4-го зуба.

На 14-ту добу на рентгенограмах нижньої щелепи справа є ознаки консолідації уламків. Краї уламків рівні за рахунок явищ остеосклерозу, але в деяких ділянках нечіткі. Щілина перелому між медіальним і дистальним уламками ледь простежувалася.

Явище остеопорозу зі слабо вираженою періостальною реакцією визначалось тільки по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця. Резорбція альвеолярного відростка в ділянці зуба не прогресувала.

На 21 добу на рентгенограмах нижньої щелепи справа (рис. 3.28) явища консолідації уламків нарастають. Краї уламків нерівні, але чіткі за рахунок остеосклерозу. Лінія перелому у верхньому і середньому відділах не простежується. У нижньому відділі лінія перелому ледь помітна. Тут же спостерігаються дрібні ділянки остеопорозу в кінцевих відділах уламків. Періостальні нашарування перекидаються з одного уламка на інший. Біля коренів 4-го зуба періостальна щілина розширена, краї її нерівні.

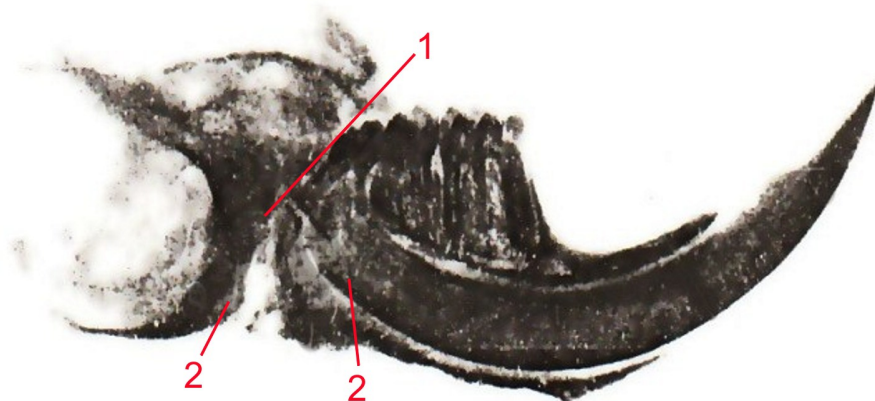


Рис. 3.28. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 21 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти та введення кальцію цитрат: 1 – лінія перелому в верхній і середній третині не прослідковується; 2 – ущільнення кінців уламків. Зб. 2.

На 30-ту добу на рентгенограмах нижньої щелепи праворуч виражені явища консолідації уламків. У кінцевих відділах уламків наростає остеосклероз. Лінія перелому вже не простежується. У місці консолідації уламків

спостерігаються періостальні нашарування по нижньому краю щелепи. В альвеолярному відростку порівняно з попереднім терміном спостереження змін не виявлено.

На 45-ту добу на рентгенограмах нижньої щелепи справа (рис. 3.29) виявлено повну консолідацію уламків. Лінія перелому не простежується. На місці перелому визначено щільну кісткову мозоль.

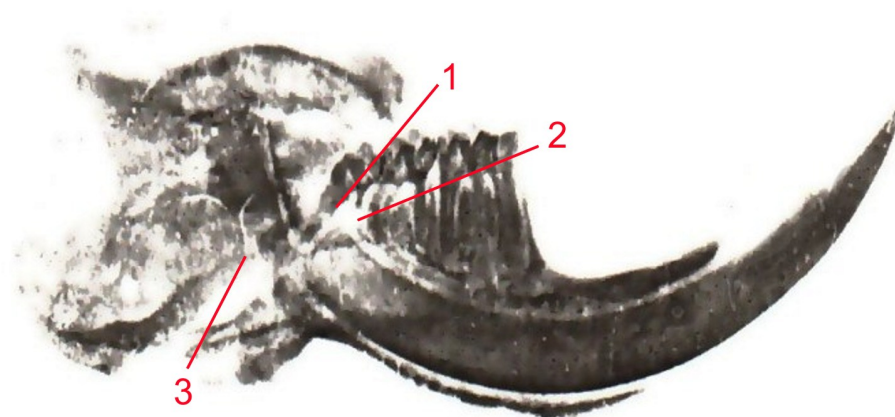


Рис. 3.29. Рентгенограма нижньої щелепи у бічній проекції справа на 45 добу після відкритого ангулярного перелому на тлі остеопорозу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти та введення кальцію цитрат: 1 – лінія перелому; 2 – щільна кісткова мозоль; 3 – повна консолідація уламків щелепи. Зб. 2.

Мікроскопічно на 7-му добу на гістограмах визначаються окремі зони некрозу і секвестри, відмежовані грануляційною тканиною й інфільтровані лейкоцитами. За грануляційним валом на збережених ділянках компактної кісткової тканини виявлені частотні поля новоутвореної кісткової тканини.

Місцями (рис. 3.30) чітко окреслені фрагменти з компактної кісткової тканини, частково з вогнищами, що не містять остеоцитів, з поверхнею яких зрощена дрібнопетлиста мережа новоутворених кісткових пластинок.

Щілина між фрагментами заповнена за рахунок мережі новоутворених кісткових пластинок (рис. 3.31) і має розмежування полів новоутвореної тканини.

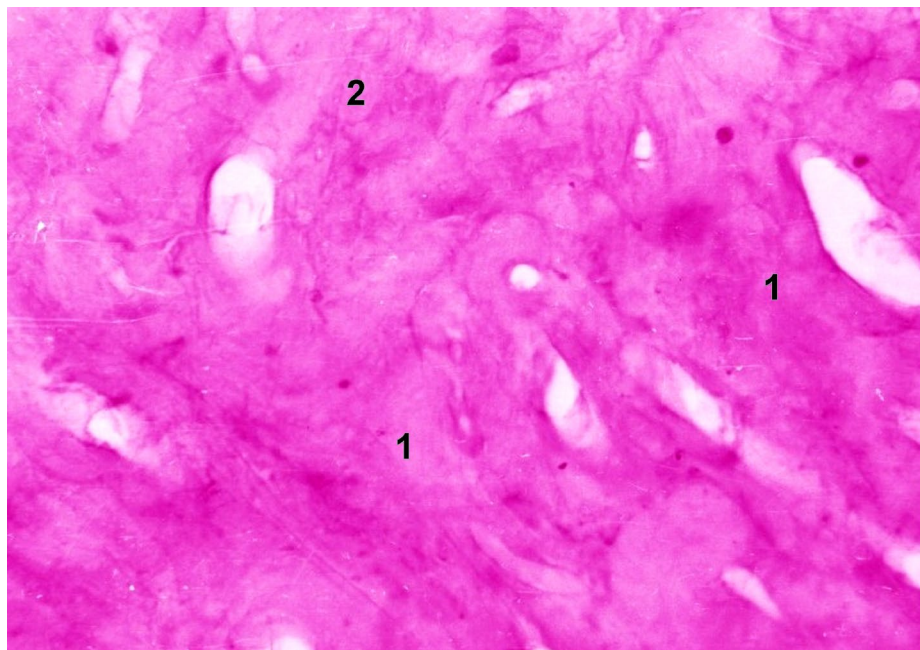


Рис. 3.30. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 7 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – поля новоутворених кісткових пластинок; 2 – безостеоцитний фрагмент пластинчастої кістки. Гематоксильн-еозин. Зб. 150.

На 14 добу на гістограмах (рис. 3.32) виявлено досить обмежені ділянки некрозу і секвестрів, відділені вузькими зонами грануляційної тканини від значних за протяжністю полів із мережі новоутворених кісткових пластинок.

На окремих ділянках (рис. 3.33) зафіксовано виражені прояви остеогенезу з трансформацією дрібнопетлистої мережі в крупнопетлисту та відмежування ділянок інфільтрації тонкими зонами грануляційної тканини. Збережені фрагменти з компактної кісткової тканини місцями піддавалися вираженому розрідженню і тісно зрощені з полями новоутворених кісткових пластинок на поверхні таких розріджених фрагментів.

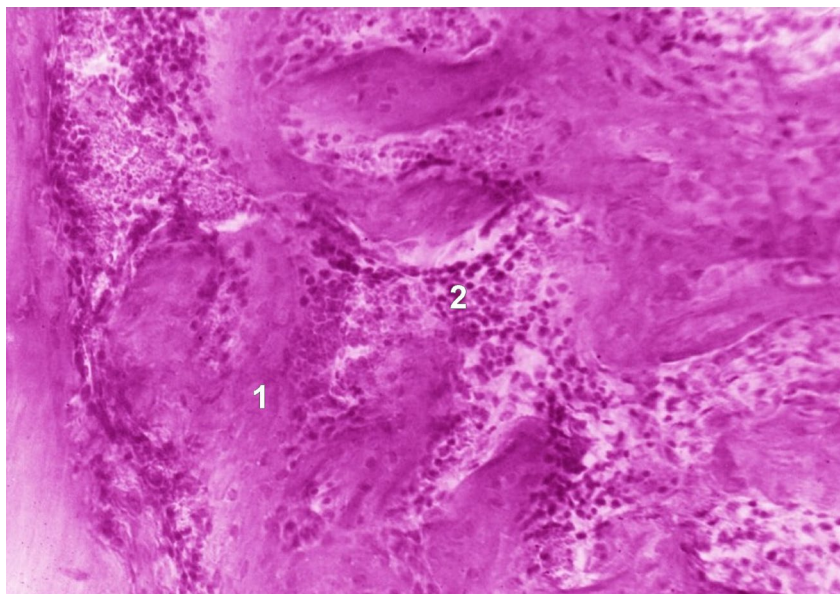


Рис. 3.31. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 7 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – мережа новоутворених кісткових пластинок; 2 – грануляційна тканина по периферії кісткових пластинок. Гематоксилін-еозин. 36.150.

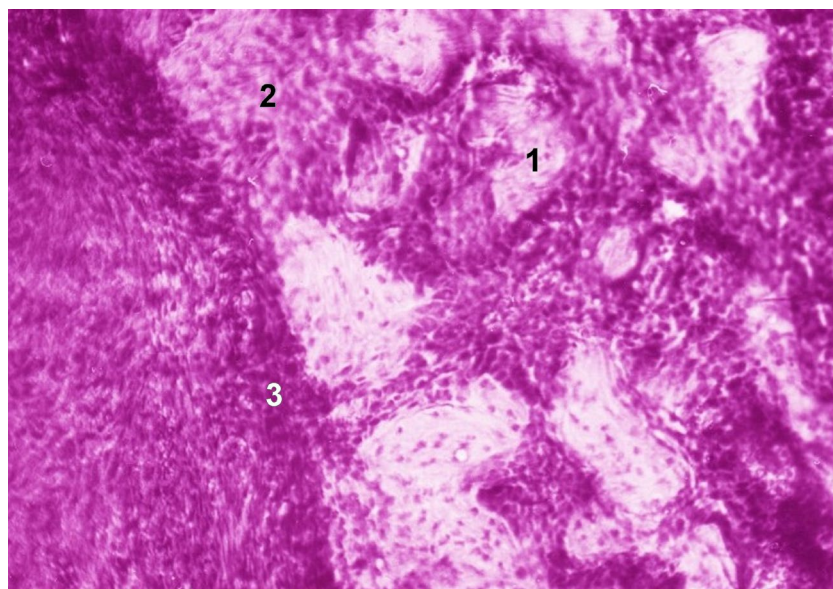


Рис. 3.32. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 14 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – поля з дрібнопетлистої та крупнопетлистої мережі кісткових пластинок, які поєднують кінці фрагментів; 2 – сполучна тканина; 3 – вогнища лейкоцитарної інфільтрації. Гематоксилін-еозин. 36.150.

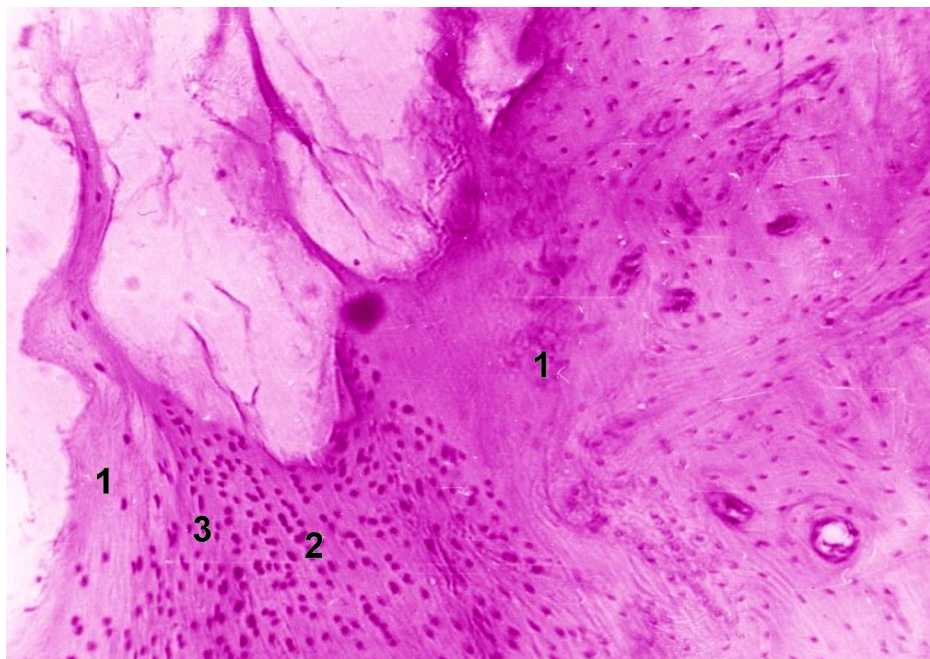


Рис. 3.33. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 14 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – поля пластинчастої кісткової тканини; 2 – грануляційна тканина; 3 – вогнища лейкоцитарної інфільтрації. Гематоксилін-еозин. Зб. 150.

На 21 добу на гістограмах (рис. 3.34) виявлено переважання полів новоутвореної кісткової тканини, за рахунок якої формувався компактний шар, хоча між цими полями і визначалися відмежовані невеликі ділянки некрозу, а також секвестри, що піддаються резорбції.

На окремих ділянках кінці фрагментів з'єднані полями з крупнопетлистою мережею кісткових пластинок, чітко відмежованих від прилеглої грануляційної тканини з багатьма пучками колагенових волокон (рис 3.35). В інших місцях поряд із вираженим остеогенезом виявлено резорбцію фрагментів кісткової тканини з утворенням масивних усередині фрагментарних порожнин.

На 30 добу на гістограмах (рис. 3.36) зафіксовано відновлення цілісності нижньої щелепи за рахунок регенерату, що складається з дрібно- і крупнопетлистої мережі новоутворених пластинок.

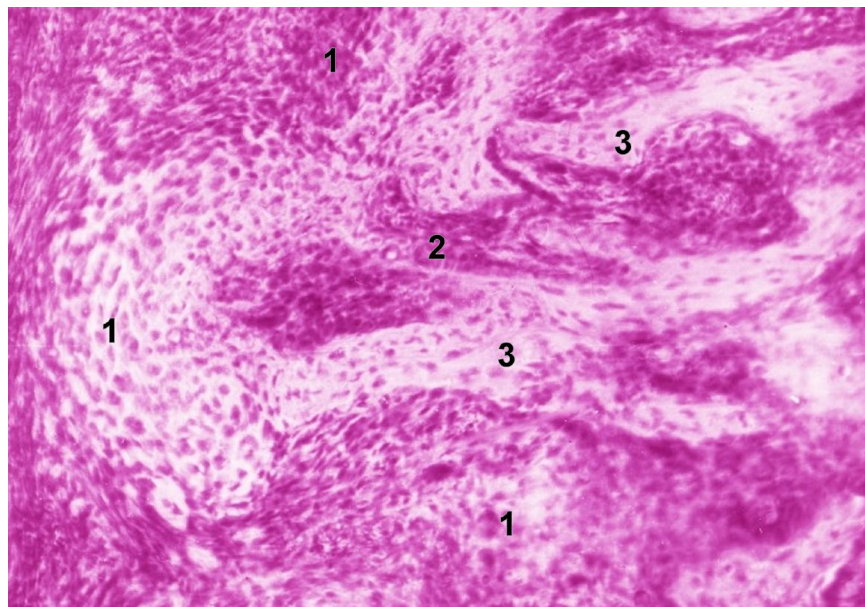


Рис. 3.34. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 21 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – кінці фрагментів кісткової тканини; 2 – крупнопетлиста мережа кісткових пластинок; 3 – сполучна тканина на периферії кісткових пластинок. Гематоксилін-еозин. Зб.150.

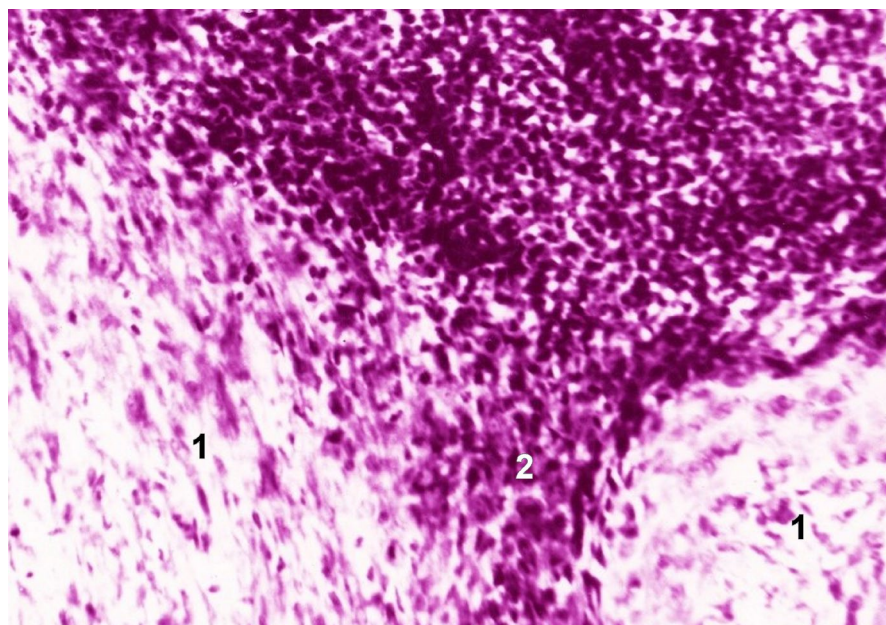


Рис. 3.35. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 21 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – розріджені різного ступеня кінці фрагментів кісткової тканини; 2 – вузька смужка зі сполучної тканини. Гематоксилін-еозин. Зб.150.

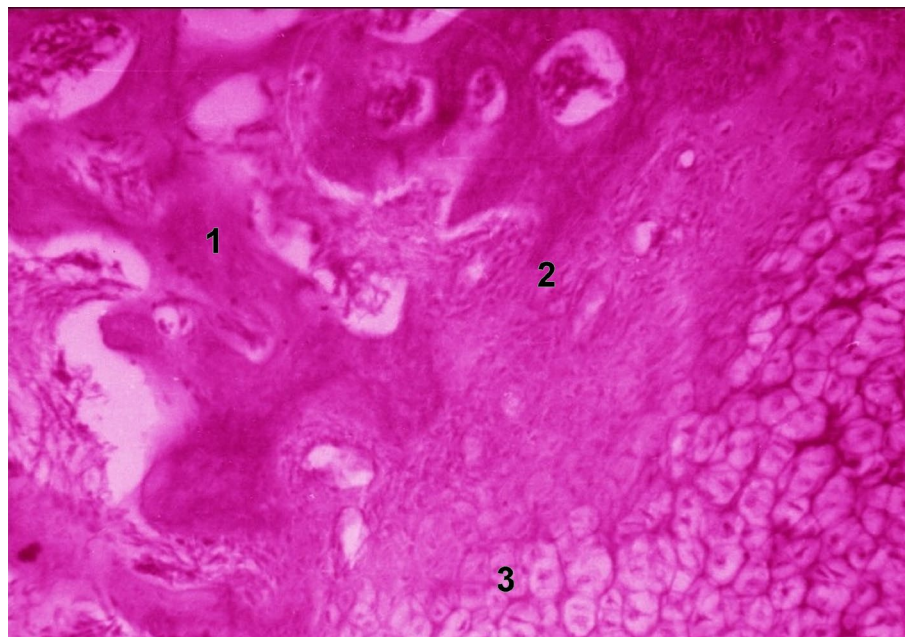


Рис. 3.36. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 30 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – кінці фрагментів кісткової тканини; 2 – новоутворена кісткова тканина; 3 – зони гіалінового хряща. Гематоксилін-еозин. 36.150.

Місцями між зонами новоутворених кісткових пластинок розташовані ділянки гіалінового хряща (див. рис. 3.36). Поля новоутворених пластинок містять фрагменти з компактної кісткової тканини, що зазнали резорбції та рарефікації (рис. 3.37).

На 45 добу на гістограмах (рис. 3.38) виявлено зрощення кінців фрагментів за рахунок новоутвореної компактної кісткової тканини.

На деяких ділянках (рис. 3.39) новоутворений кортикальний шар складається з компактної кісткової тканини з хаотичним розміщенням систем остеонів і вогнищ, що не містять остеоцитів. Відносно безладне розташування різної величини остеонів спостерігалось майже на всьому кортикальному шарі.

Зауважимо, що в усі терміни спостереження остеогенний компонент переважав над фіброгенними компонентами, що свідчить про більш інтен-

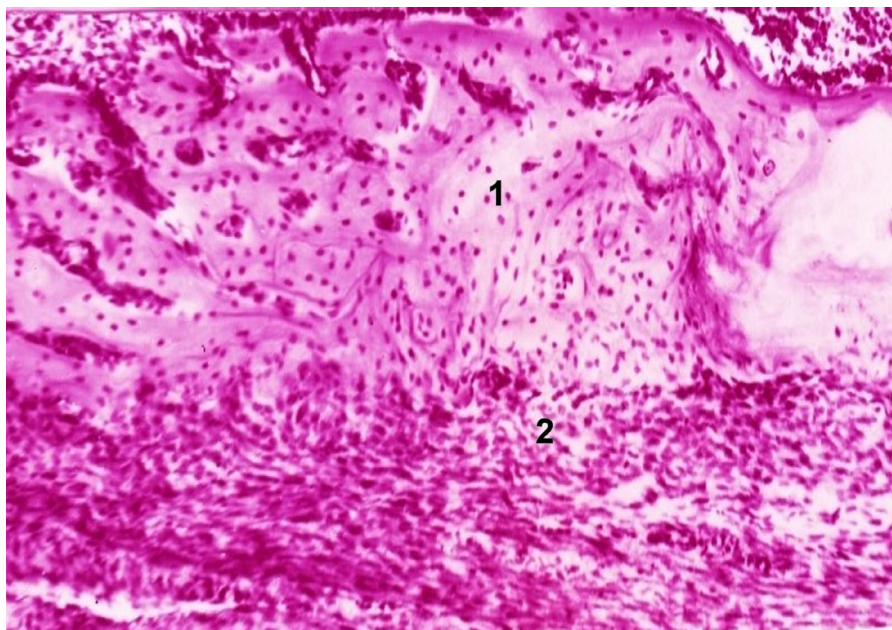


Рис. 3.37. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 30 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – кінці фрагментів, які складаються з розрідженої пластинчастої кістки; 2 – нашарування новоутвореної кісткової тканини. Гематоксилін-еозин. Зб.150.

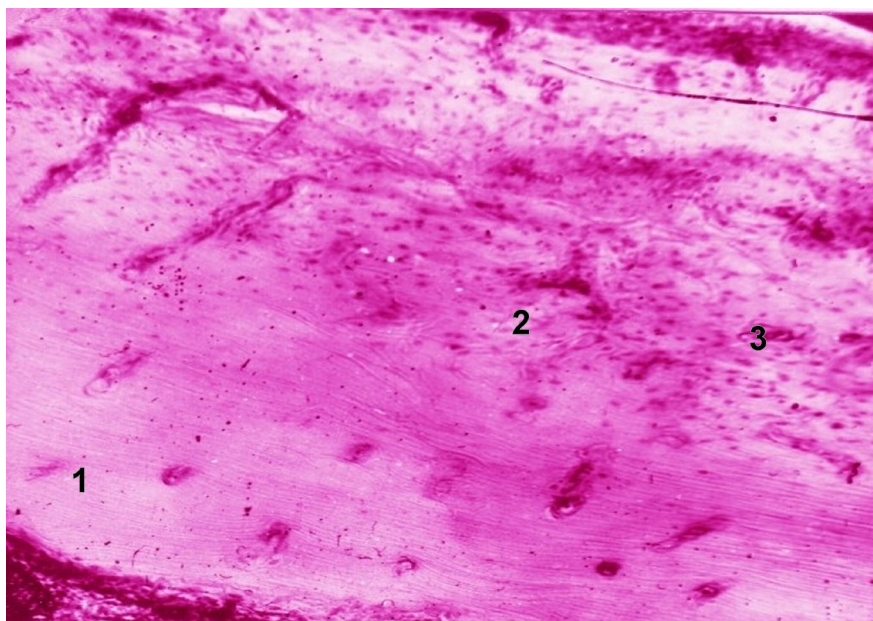


Рис. 3.38. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 45 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – кінці фрагментів кісткової тканини; 2 – поля новоутвореної кісткової тканини; 3 – остеони, що формуються. Гематоксилін-еозин. Зб.150.

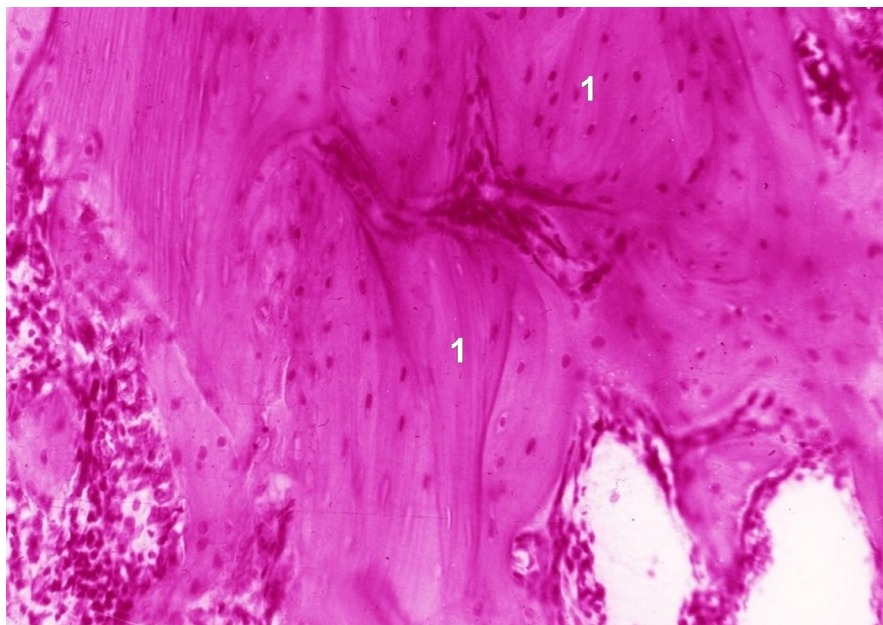


Рис. 3.39. Фрагменти кістки нижньої щелепи щурів на 45 добу після її перелому на тлі остеопорозу, яким після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вводили кальцію цитрат: 1 – структура пластинчастої компактної кісткової тканини на місці зрощення фрагментів. Гематоксилін-еозин. Зб.150.

сивні процеси остеогенезу, які забезпечили зрощення фрагментів уже до 30 доби. Таким чином, дія комплексу застосованих нами кріоконсервованої тканини плаценти і кальцію цитрат істотно змінюють морфогенез регенерату кістки нижньої щелепи. Їхнє одночасне застосування призводить до значного зменшення площі некротичних змін у зоні пошкодження й інтенсифікації остеогенезу. Все це обумовлює швидке відмежування ділянок некрозу і формування до 21 доби полів новоутвореної кісткової тканини у вигляді дрібнопетлистої мережі кісткових пластинок, за рахунок чого відбувається зрощення країв перелому. Виявлено також формування компактної кістки.

Результати досліджень, представлені в цьому розділі дисертації, викладені в 3-х наукових статтях, уміщених у фахових виданнях, та 3-х тезах науково-практичних конференцій:

Лихицкий АА. Влияние кріоконсервированной плацентарной ткани

на остеогенез в експерименте при переломе нижней челюсти. Клінічна стоматологія. 2016 Лют;1(14):37-41. [63]

Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Rengenological features of morphogenesis of regenerate in rats with open fracture of lower jaw with osteoporosis which recepted the calcium citrate with improvement of cryoplacenta. Reports of Morphology. 2017 Oct; 2(23):248-52. [156]

Lykhytskyi OO. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2017 Oct;27(29):32-6. [180]

Лихицкий АА. Репаративная регенерация костной ткани под влиянием криоконсервированной плаценты. В журнале «Проблемы криобиологии и криомедицины» 2014 Май; 2(Том 24, стр. 170). Харьков. [62]

Lykhytskyi OO. Study the influence of cryopreserved placenta on process of reparative bone regeneration. In present issue of «Medical Review» included abstracts of reports of 4th Annual International Scientific-Practical Conference «Medicine Pressing Questions» 2015 Oct; (Vol. 2, p. 42). Baku. [182]

Ліхницький ОО. Особливості репаративного остеогенезу в експерименті при відкритому переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації криоконсервованої тканини плаценти людини. В збірнику тез «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» 2018 січ. (стор. 111-114). Львів, ГО «Львівська медична спільнота». [64]

РОЗДІЛ 4
ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ІМУНОЗАПАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ,
ЕНДОТОКСЕМІЇ, ОКСИДАТИВНОГО ТА НІТРОЗАТИВНОГО
СТРЕСІВ У РЕГУЛЯЦІЇ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ
У ЩУРІВ ІЗ ВІДКРИТИМ АНГУЛЯРНИМ ПЕРЕЛОМОМ НИЖНЬОЇ
ЩЕЛЕПИ НА ТЛІ ОСТЕОПОРОЗУ

Репаративний остеогенез є генетично запрограмованим процесом, перебіг якого залежить від дії багатьох екзо- та ендогенних чинників [55, 96]. Серед них вагоме місце посідає група факторів, що детермінують остеοіндуктивний потенціал організму та активність процесів резорбції / біосинтезу кісткової тканини на момент травми, а саме вік, стать, наявність метаболічних розладів (цукровий діабет, атеросклероз), імунологічний статус тощо [96, 202]. Одним із важливих чинників, який модифікує перебіг репаративного остеогенезу, є остеопороз [55]. Однак, молекулярні механізми, інтегровані в процеси остеорепації, за цих умов здебільшого залишаються невідомим. Все це затримує розробку високочутливих методів контролю за перебігом репаративного остеогенезу при переломах, які виникають на тлі остеопорозу. Тому метою цього розділу було оцінити роль імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів у регуляції репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу і на цій основі ідентифікувати найбільш чутливі біохімічні маркери перебігу процесів остеорепації за даної патології.

Досліди проведено на двох групах тварин: 1 група (псевдооперовані) – псевдооперовані щурі (ПО); 2 група (дослід) - щурі з модельованим відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (ПНШ + ОП). Дослідження виконано на 7, 14, 21, 30 та 45 добу після моделювання перелому. У сироватці крові проводили оцінку цитокінового

профілю (вміст ФНП- α , IL-8, VEGF, ТФР- β 1), показників оксидативного та нітрозативного стресів (вміст ТБК-РП, КГП, нітритів та нітратів, активність НАДФН-оксидази, СОД) та маркерів метаболізму кісткової тканини (вміст загального кальцію, фосфатів, вільного та пептидозв'язаного оксипроліну, активність лужної та кислої фосфатаз, індекс мінералізації кісткової тканини). Також проведено кореляційний аналіз між біохімічними маркерами стану кісткової тканини та показниками імунозапальних процесів, оксидативного та нітрозативного стресів у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Для ідентифікації важливих та незалежних маркерів перебігу репаративного остеогенезу проведено множинний лінійний регресійний аналіз.

4.1. Оцінка вмісту в крові прозапальних цитокінів та факторів росту в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

У щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу відмічено розвиток імунозапальних реакцій, доказом чого є зміни рівня прозапального цитокіну ФНП- α в різні періоди репаративного остеогенезу (табл. 4.1). Станом на 7 і 14 добу експерименту вміст ФНП- α в сироватці крові достовірно зростає відповідно на 58,5 та 76,5% відносно показників псевдооперованих тварин. Максимальний рівень цього цитокіну зареєстровано на 21 добу після травми (на 86,1% перевищує показник контролю). У цей термін репаративного остеогенезу вміст ФНП- α достовірно перевищує на 23,5 та 12,0% відповідні показники, які були зафіксовані на 7 і 14 добу після перелому. У наступні терміни дослідження спостерігали стрімке падіння його рівня в крові. Станом на 30 добу експерименту вміст ФНП- α був достовірно меншим на 28,2% порівняно з показником 21 доби,

але його рівень все ще був достовірно вищим порівняно з відповідним показником групи контролю. Лише через 45 діб після травми нижньої щелепи показник ФНП- α повертався до рівня псевдооперованої групи тварин.

Таблиця 4.1

Зміни вмісту в крові ФНП- α у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ФНП- α , пг/мл	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЦ + ОП
7 доба	21,20 $\pm$ 1,37	33,60 $\pm$ 2,74*
14 доба	21,00 $\pm$ 1,67	37,07 $\pm$ 4,45*
21 доба	22,30 $\pm$ 1,52	41,49 $\pm$ 4,44* [#]
30 доба	22,10 $\pm$ 1,57	29,83 $\pm$ 2,88* ^{#&°}
45 доба	22,50 $\pm$ 1,71	24,10 $\pm$ 3,31 ^{#&°}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. [°] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Додаткові докази важливої ролі імунозапальних реакцій у регуляції репаративного остеогенезу отримано при дослідженні рівня ІЛ-8 у сироватці крові (табл. 4.2). Виявилось, що протягом перших трьох тижнів після перелому відмічалось вірогідне підвищення вмісту цього цитокіну в крові (на 7, 14 та 21 добу експерименту його рівень відповідно зростав на 25,4; 39,7 та 56,4% відносно показників псевдооперованої групи). Далі рівень ІЛ-8 у сироватці крові різко знижувався: станом на 30 добу його вміст переви-

щував такий в контролі лише на 28,6%, а на 45 добу після перелому рівень цього цитокіну статистично вірогідно не відрізнявся від відповідного показника псевдооперованих тварин.

Таблиця 4.2

Зміни вмісту в крові ІЛ-8 у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ІЛ-8, пг/мл	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	21,14 $\pm$ 2,85	26,50 $\pm$ 2,89*
14 доба	23,20 $\pm$ 3,14	32,40 $\pm$ 3,36*#
21 доба	21,80 $\pm$ 3,18	34,10 $\pm$ 3,48*#
30 доба	22,40 $\pm$ 3,11	28,80 $\pm$ 3,18*&°
45 доба	22,80 $\pm$ 3,31	23,20 $\pm$ 3,36&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

За умов перелому нижньої щелепи, який виникав на тлі остеопорозу, індукція ангіогенезу реєструється лише на 21 добу експерименту (табл. 4.3). Аналіз показника VEGF у сироватці крові показав, що протягом перших двох тижнів після перелому його рівень статистично вірогідно не відрізнявся від величин псевдооперованої групи і лише станом на 21 добу після травми нижньої щелепи вміст цього цитокіну вірогідно перевищував показник псевдооперованих тварин на 12,8%. Найбільш виражена індукція ангіо-

генезу зафіксована на 30 добу експерименту: рівень VEGF у сироватці крові вірогідно зростав на 24,7% відносно контролю. Станом на 30 добу рівень цього цитокіну вірогідно не відрізнявся від показника псевдооперованої групи тварин.

Таблиця 4.3

Зміни вмісту в крові VEGF у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	VEGF, пг/мл	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	67,50±5,76	69,84±6,45
14 доба	64,39±6,05	70,58±8,41
21 доба	65,80±5,19	74,25±7,70*
30 доба	66,20±5,71	82,54±7,21*#&°
45 доба	65,70±5,88	64,90±6,30°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

За умов експериментальної патології нами встановлено, що лише на 21 добу після травми зафіксована виразна індукція остеобластів, про що доказово свідчить відповідна зміна рівня фактора росту ТФР- $\beta 1$ у різні терміни репаративного остеогенезу (табл. 4.4). Виявилось, що станом на 7 та 14 добу експерименту вміст цього цитокіну вірогідно не відрізнявся від псевдооперованої групи. Натомість на 21 добу після перелому рівень ТФР-

$\beta 1$ вірогідно перевищував показники псевдооперованої групи тварин на 46,5%. Надалі його рівень спершу зростав (станом на 30 добу вміст ТФР- $\beta 1$ перевищував показник псевдооперованих тварин на 65,3%), а далі на 45 добу після перелому повертався до рівня псевдооперованих тварин.

Таблиця 4.4

Зміни вмісту в крові ТФР- $\beta 1$ у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ТФР- $\beta 1$, пг/мл	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	130,0 $\pm$ 7,0	134,1 $\pm$ 11,6
14 доба	128,0 $\pm$ 6,7	134,6 $\pm$ 13,8
21 доба	126,0 $\pm$ 6,6	184,6 $\pm$ 7,9*#&
30 доба	127,0 $\pm$ 6,9	210,0 $\pm$ 8,0*#&°
45 доба	131,0 $\pm$ 6,8	136,0 $\pm$ 6,2°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Отже, дослідження цитокінового профілю сироватки крові в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу дозволило виявити певні закономірності. Встановлено, що вже на 7 добу після травми відбувається вірогідне зростання рівня прозапальних цитокінів ФНП- α та ІЛ-8, показники яких досягають максимуму на 14-21 добу експерименту, після чого по-

ступово знижуються до величин псевдооперованих тварин. У той же час вміст фактора ангіогенезу VEGF та ростового фактора остеобластів ТФР- β 1 не зазнають змін протягом перших двох тижнів експерименту і лише на 21-30 добу після перелому встановлено вірогідне зростання їх рівня в сироватці крові, а далі вміст цих цитокінів стрімко знижується до рівня контролю.

4.2. Визначення в крові рівня маркерів ендотоксемії, вільнорадикального окиснення та показників проантиоксидантної систем у різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

У щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи реєструється активація вільнорадикального окиснення ліпідів (табл. 4.5). Вміст у крові ТБК-РП змінювався вже на першому тижні після перелому: його рівень вірогідно перевищував відповідний показник псевдооперованої групи на 60,0%. Станом на 14 добу рівень ТБК-РП у сироватці крові був достовірно більшим на 84,0% відносно групи псевдооперованих тварин і статистично вірогідно не відрізнявся від такого показника станом на 7 добу експерименту. Максимальних показників рівень ТБК-РП досягав на 21 добу експерименту: його величина була на 91,9% вищою, ніж у контролі. У цей термін дослідження вміст вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів хоча був найвищий, але статистично достовірно не перевищував відповідний показник, зафіксований станом на 14 добу експерименту. Далі, в процесі перебігу репаративного остеогенезу, відмічено статистично вірогідне падіння рівня продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів. Так, через місяць після травми нижньої щелепи рівень ТБК-РП у крові статистично вірогідно зменшується приблизно на 22%, але все ще достовірно вищий на

49,1% порівняно з показником контролю. Станом на 45 добу експерименту відбувається статистично достовірне зменшення вмісту продуктів перекисної модифікації ліпідів відповідно на 28 та 44% порівняно з показниками на 21 та 30 добу після перелому нижньої щелепи. У цей час дослідження рівень ТБК-РП статистично вірогідно не відрізняється від такого показника у псевдооперованих тварин.

Таблиця 4.5

Зміни вмісту в крові ТБК-РП у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ТБК-РП, мкмоль/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	3,250 $\pm$ 0,367	5,200 $\pm$ 0,735*
14 доба	3,180 $\pm$ 0,441	5,850 $\pm$ 0,955*
21 доба	3,200 $\pm$ 0,490	6,140 $\pm$ 1,078* [#]
30 доба	3,220 $\pm$ 0,686	4,800 $\pm$ 1,176* ^{&°}
45 доба	3,190 $\pm$ 0,784	3,450 $\pm$ 1,102 ^{&°}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. [°] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

У дослідній групі щурів на тлі активації вільнорадикального окиснення ліпідів реєструється індукція окисної модифікації протеїнів (табл. 4.6). З'ясувалось, що вже на початкових етапах репаративного остеогенезу (7 доба) відбувається достовірне зростання на 54,0% окисномодифікованих

протеїнів КГП порівняно з показником у псевдооперованих щурів. У подальшому рівень КГП у сироватці крові зростав і станом на 14 добу був на 100% вищим, ніж у псевдооперованій групі. Станом на 21 добу нами зафіксовано максимальний рівень КГП, який перевищував відповідний показник псевдооперованої групи на 104%, але він не відрізнявся від такого на 14 добу експерименту. У наступні терміни репаративного остеогенезу вміст окисномодифікованих протеїнів достовірно зменшувався на 36,9% (станом на 30 добу) та 21,6% (станом на 45 добу) порівняно з показником на 21 добу експерименту.

Таблиця 4.6

Зміни вмісту в крові КГП у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	КГП, од.опт.щ/мг протеїну	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	45,20 $\pm$ 2,79	69,60 $\pm$ 4,58*
14 доба	44,70 $\pm$ 3,04	89,40 $\pm$ 4,78*#
21 доба	45,40 $\pm$ 3,26	92,80 $\pm$ 5,83*#
30 доба	45,00 $\pm$ 3,09	62,40 $\pm$ 4,14*&°
45 доба	45,80 $\pm$ 3,80	48,90 $\pm$ 4,16#&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Гіперактивація процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів за умов перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу пов'язана з індукцією ферментної прооксидантної системи (табл. 4.7). Дослідження продукції сепероксидного аніон-радикалу за участі НАДФН-оксидази в різні терміни репаративного остеогенезу показало, що вже станом на 7 добу експерименту активність цього прооксидантного ензиму достовірно зростає на 35,4% порівняно з показником псевдооперованої групи. Більш виразне зростання активності НАДФН-оксидази відмічено на 14 добу після перелому (на 51,9% перевищує величину псевдооперованої групи). Станом на 21 добу експерименту зафіксована максимальна ензиматична продукція сепероксидного аніону: активність НАДФН-оксидази на 55,6% перевищує показник у псевдооперованих щурів. У більш пізні терміни репаративного остеогенезу відбувалось достовірне зменшення активності цього ензиму: станом на 30 добу вона була на 38,1% вищою порівняно з показником у псевдооперованих тварин і станом на 45 добу статистично вірогідно не відрізнялась від величин псевдооперованої групи.

Таблиця 4.7

Зміни активності в крові НАДФН-оксидази у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мл	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	2,400±0,147	3,250±0,196*
14 доба	2,370±0,201	3,600±0,172*#
21 доба	2,410±0,098	3,750±0,196*#
30 доба	2,390±0,123	3,300±0,123*&°
45 доба	2,420±0,196	2,550±0,196#&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин

відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

За умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу відбувається депресія ферментативної антиоксидантної ланки (табл. 4.8). У процесі репаративного остеогенезу пригнічується інактивація супероксидного аніону за участі СОД, максимально виражена на 21 добу експерименту. Станом на 7-14 добу експерименту вірогідно знижується активність СОД на 18,7-38,6% порівняно з контролем. Далі, на 21 добу експерименту, зменшення активності цього ферменту було максимальне і становило 45,7% порівняно з псевдооперованими тваринами. У більш пізні терміни реєструвалось відновлення активності СОД, і станом на 45 добу вона достовірно не відрізнялась від контролю.

Таблиця 4.8

Зміни активності в крові СОД у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	СОД, ум.од./мг протеїна	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	32,60 $\pm$ 2,74	26,50 $\pm$ 2,72*
14 доба	33,20 $\pm$ 3,04	20,40 $\pm$ 2,99*#
21 доба	32,80 $\pm$ 2,89	17,80 $\pm$ 3,14*#
30 доба	33,40 $\pm$ 3,18	26,60 $\pm$ 3,31*°&°
45 доба	33,10 $\pm$ 3,33	29,88 $\pm$ 3,33#&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин

відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

За умов експериментальної патології разом зі зростанням генерації кисневих дериватів відбувається посилення продукції активних форм нітрогену, що супроводжується розвитком нітрозативного стресу (табл. 4.9). Протягом перших двох тижнів після перелому вміст нітритів та нітратів вірогідно зростає на 30,2-44,7% відносно контролю і досягає максимальних величин на 21 добу експерименту (на 52,4% перевищує показник контролю). Станом на 30 добу рівень метаболітів нітроген монооксиду достовірно зменшується на 18,2%, порівняно з попереднім терміном експерименту і повертається до значень псевдооперованої групи на 45 добу експерименту.

Таблиця 4.9

Зміни вмісту в крові метаболітів нітроген монооксиду у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорузу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Нітрити та нітрати, мкмоль/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	92,11 $\pm$ 8,21	120,0 $\pm$ 10,0*
14 доба	95,40 $\pm$ 8,38	138,0 $\pm$ 10,3*#
21 доба	93,60 $\pm$ 9,23	142,6 $\pm$ 13,5*#
30 доба	96,19 $\pm$ 9,06	121,0 $\pm$ 10,8*&°
45 доба	94,80 $\pm$ 7,84	99,34 $\pm$ 8,32#&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин

відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

У тварин з переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу реєструється розвиток ендотоксемії (табл. 4.10). Так, уже протягом першого тижня експерименту спостерігаються ознаки ендотоксемії, про що свідчить вірогідне зростання в крові рівня МСМ на 23,1% відносно контролю. Станом на 14 і 21 добу після перелому приріст МСМ відносно контролю є вищим і становить відповідно 39,1 та 40,3%. У більш пізні терміни дослідження зменшують ознаки ендотоксемії: станом на 30 добу після експериментального перелому рівень МСМ перевищує величини псевдооперованої групи на 25,8%, а на 45 добу статистично вірогідно не відрізняється від показників псевдооперованих тварин.

Таблиця 4.10

Зміни вмісту в крові МСМ у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	МСМ, од.опт.щ.	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	0,130 $\pm$ 0,020	0,160 $\pm$ 0,022*
14 доба	0,133 $\pm$ 0,022	0,185 $\pm$ 0,025*#
21 доба	0,140 $\pm$ 0,015	0,196 $\pm$ 0,016*#
30 доба	0,132 $\pm$ 0,012	0,180 $\pm$ 0,015*
45 доба	0,136 $\pm$ 0,020	0,147 $\pm$ 0,020°°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин

відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Проведені дослідження засвідчили, що в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу є відмінності в інтенсивності ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів. Установлено, що протягом перших трьох тижнів репаративного остеогенезу відбувається посилення ендотоксемії, нітрозативного стресу, вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, зростання активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази та одночасне зменшення активності антиоксидантного ензиму СОД. Найбільш виразні зміни вказаних біохімічних процесів відмічено на 14-21 добу експерименту. У більш пізні терміни репаративного остеогенезу інтенсивність ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів зменшується і повертається до рівня контролю за станом на 45 добу експерименту.

4.3. Дослідження біохімічних показників метаболізму кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Дослідження метаболізму кальцію у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу показало, що на різних етапах репаративного остеогенезу відбуваються різноспрямовані зміни в обміні цього макроелементу (табл. 4.11). Виявилось, що на 7 добу після пере-

Таблиця 4.11

Зміни вмісту в крові загального кальцію у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Загальний кальцій, ммоль/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	2,080±0,294	2,490±0,316*
14 доба	2,020±0,343	1,760±0,367 [#]
21 доба	2,100±0,392	1,350±0,269* [#]
30 доба	2,060±0,441	1,400±0,174* [#]
45 доба	2,090±0,318	2,180±0,367 ^{&°}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. [°] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

лому спостерігається позитивний кальцієвий баланс: рівень кальцію в сироватці крові достовірно зростає на 19,7% відносно псевдооперованої групи групи. Натомість на 3-4 тижні експерименту реєструється зміна вектору кальцієвого балансу: вміст кальцію в сироватці крові вірогідно зменшується на 35,7% (станом на 21 добу) та 32,0% (станом на 30 добу експерименту) порівняно з показником у 1 групі тварин. У більш пізні строки репаративного остеогенезу (на 45 добу) нормалізується кальцієвий обмін: рівень цього макроелементу в сироватці крові статистично достовірно не відрізняється від показника у псевдооперованих тварин.

Метаболізм кальцію тісно пов'язаний з обміном фосфору, тому в по-

дальшому ми оцінили зміни його метаболізму на різних етапах репаративного остеогенезу за умов експериментальної патології (табл. 4.12). Установлено, що протягом перших трьох тижнів після травми відбувається поступове зростання рівня фосфатів у сироватці крові. Так, за станом на 7 добу рівень фосфатів у крові збільшується на 24,8% відносно контролю. Більш виразний приріст фосфатів відносно псевдооперованої групи реєструвався на 14 добу (36,5%) та особливо на 21 добу експерименту (45,3%). У пізні строки репаративного остеогенезу (на 30-45 добу) обмін фосфору нормалізується і рівень цього мікроелементу в крові наближається до такого в псевдооперованій групі.

Таблиця 4.12

Зміни вмісту в крові фосфатів у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Фосфати, ммоль/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	1,400 $\pm$ 0,294	1,747 $\pm$ 0,126*
14 доба	1,450 $\pm$ 0,343	1,980 $\pm$ 0,294*
21 доба	1,480 $\pm$ 0,269	2,150 $\pm$ 0,318*#
30 доба	1,420 $\pm$ 0,318	1,810 $\pm$ 0,392
45 доба	1,460 $\pm$ 0,392	1,570 $\pm$ 0,367 ^{&°}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

За умов експериментальної патології в різні терміни остеорепарації процеси катаболізму колагену проходять із різною інтенсивністю (табл. 4.13). На ранніх термінах остеорепарації відбувається прогресивне зростання вмісту в крові вільного оксипроліну: станом на 7 добу експерименту – на 59,8%, а станом на 14 добу – на 114% відносно контролю. Починаючи з 21 доби після перелому, вміст вільного оксипроліну в сироватці крові достовірно зменшується на 34,0% відносно показника, зафіксованого на попередньому терміні дослідження. На пізніх строках реєструється подальше зменшення рівня цього показника, і станом на 45 добу рівень вільного оксипроліну наближається до такого в псевдооперованій групі тварин.

Таблиця 4.13

Зміни вмісту в крові вільного оксипроліну у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Вільний оксипролін, мкмоль/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	22,40 $\pm$ 1,18	35,80 $\pm$ 1,62*
14 доба	22,80 $\pm$ 1,10	48,80 $\pm$ 1,76* [#]
21 доба	22,30 $\pm$ 0,98	32,20 $\pm$ 1,69* ^{#&}
30 доба	22,50 $\pm$ 1,20	26,80 $\pm$ 1,32* ^{#&°}
45 доба	22,60 $\pm$ 1,15	23,20 $\pm$ 1,42 ^{#&°}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. [°] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Далі ми оцінили зміни активності біосинтезу колагену у щурів псевдооперованої та дослідної груп (табл. 4.14). Виявилось, що на ранніх етапах репаративного остеогенезу (7-14 доба) процеси синтезу колагену проходять з тією ж інтенсивністю, що і в псевдооперованій групі, доказом чого є відсутність статистично вірогідних змін рівня пептидозв'язаного оксипроліну відносно показника псевдооперованої групи. Інтенсивність синтезу колагену зростає на 21 добу і досягає максимуму на 30 добу експерименту (станом на 21 та 30 добу вміст пептидозв'язаного оксипроліну відповідно на 20 та 44,6% вищий, ніж у контролі). Станом на 45 добу після перелому вміст у крові пептидозв'язаного оксипроліну статистично вірогідно не відрізняється від показника у псевдооперованих тварин.

Таблиця 4.14

Зміни вмісту в крові пептидозв'язаного оксипроліну у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Пептидозв'язаний оксипролін, мкмоль/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	26,80 $\pm$ 2,50	27,40 $\pm$ 2,89
14 доба	27,30 $\pm$ 2,77	28,80 $\pm$ 3,37
21 доба	27,70 $\pm$ 2,94	33,21 $\pm$ 3,89*#&
30 доба	27,10 $\pm$ 3,06	39,18 $\pm$ 4,19*#&
45 доба	27,50 $\pm$ 2,96	28,10 $\pm$ 3,26°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Біохімічним маркером, який відображає активність процесів ремоделювання кісткової тканини і характеризує стан остеобластів, вважається активність лужної фосфатази в сироватці крові (табл. 4.15). З'ясувалось, що у період з 7 по 14 добу після перелому активність цього ензиму достовірно не відрізняється від показників псевдооперованої групи тварин. Станом на 21 добу реєструється зростання активності лужної фосфатази (на 17,8% перевищує показники псевдооперованої групи). Натомість максимальна активність цього ферменту, яка перевищує показники контрольної групи на 27%, зафіксована на 30 добу. Нормалізація активності лужної фосфатази спостерігається на 45 добу репаративного остеогенезу, про що доказово свідчить відсутність статистично достовірних змін цього показника відносно такого у псевдооперованих тварин.

Таблиця 4.15

Зміни активності в крові лужної фосфатази у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Лужна фосфатаза, Од/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	448,0 $\pm$ 20,2	460,0 $\pm$ 21,8
14 доба	450,0 $\pm$ 21,0	464,0 $\pm$ 15,5
21 доба	454,0 $\pm$ 22,3	535,0 $\pm$ 16,5*#&
30 доба	452,0 $\pm$ 22,0	574,0 $\pm$ 22,6*#&°
45 доба	451,0 $\pm$ 21,8	465,0 $\pm$ 23,9°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дос-

лідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Далі ми оцінили активність кислої фосфатази, яка також є біохімічним маркером ремоделювання кісткової тканини, але характеризує стан остеокластів (табл. 4.16). Доведено, що висока активність кислої фосфатази реєструється протягом перших трьох тижнів після перелому: приріст активності ферменту на 7 добу становить 49,6%, на 14 добу – 65,8%, на 21 добу – 45,6% відносно показників контролю. Станом на 30 добу активність кислої фосфатази вірогідно знижується відносно попередніх термінів, але її показник на 35,2% перевищує показники псевдооперованої групи. Нормалізація активності цього ферменту відмічається на 45 добу після перелому.

Таблиця 4.16

Зміни активності в крові кислої фосфатази у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Кисла фосфатаза, Од/л	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЩ + ОП
7 доба	11,20 $\pm$ 1,27	16,75 $\pm$ 1,13*
14 доба	11,40 $\pm$ 1,18	18,90 $\pm$ 1,52*#
21 доба	11,34 $\pm$ 0,82	16,50 $\pm$ 1,84*&
30 доба	11,10 $\pm$ 0,86	15,01 $\pm$ 0,59*#&°
45 доба	11,32 $\pm$ 1,12	11,92 $\pm$ 1,43#&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

У подальшому ми оцінили співвідношення між активністю в крові лужної та кислої фосфатаз (індекс мінералізації), що є біохімічним маркером інтенсивності мінералізації кісткової тканини (табл. 4.17). Виявилось, що найменша величина індексу мінералізації спостерігається на початкових етапах остеорепарації: зменшення цього індексу відносно контролю становить 31,6% на 7 добу експерименту та 38,0% на 14 добу експерименту. На наступних етапах репаративного остеогенезу виявлено збільшення вказаного індексу, але станом на 21 та 30 добу він ще вірогідно менший, ніж у псевдооперованих групах (відповідно на 18,6 та 6,2%), і лише на 45 добу величина цього індексу наближається до такої в псевдооперованій групі тварин.

Таблиця 4.17

Зміни індексу мінералізації у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорузу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Індекс мінералізації	
	1 група (n=7): ПО	2 група (n=7): ПНЦ + ОП
7 доба	40,32 $\pm$ 3,54	27,57 $\pm$ 2,32*
14 доба	39,72 $\pm$ 3,08	24,64 $\pm$ 1,45*#
21 доба	40,14 $\pm$ 1,88	32,69 $\pm$ 2,97*#&
30 доба	40,82 $\pm$ 2,10	38,29 $\pm$ 2,08*#&°
45 доба	40,08 $\pm$ 3,03	39,38 $\pm$ 3,85*#&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 1 та 2 груп тварин відповідного строку дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу.

Таким чином, перебіг репаративного остеогенезу супроводжується низкою метаболічних змін, які мають певну стадійність. Так, на 7 добу відмічено індукцію остеокластів (зростання активності кислої фосфатази порівняно з контролем), посилення катаболізму органічного та неорганічного матриксів кісткової тканини (зростання вмісту кальцію, фосфатів та вільного оксипроліну в крові порівняно з контролем) та зниження мінеральної щільності кісткової тканини (значне зменшення індексу мінералізації відносно контролю). Станом на 14 добу активність остеодеструктивних та катаболічних процесів (деградація колагену) досягає максимуму, що супроводжується найбільшим зниженням мінеральної щільності кісткової тканини. У той же час станом на 21 та 30 добу інтенсивність остеолізису та катаболізму колагену зменшується, разом із цим активуються клітини остеобластичного диферону (зростає активність лужної фосфатази відносно контролю), посилюються процеси колагеноутворення (зростає вміст пептидозв'язаного оксипроліну відносно контролю) та мінералізація кісткової тканини (зростає індекс мінералізації та зменшується вміст кальцію в крові відносно контролю). На 45 добу досліджувані біохімічні показники метаболізму кісткової тканини повертаються до норми.

4.4. Оцінка взаємозв'язків між біохімічними маркерами стану кісткової тканини та показниками імунозапальних процесів, оксидативного та нітрозативного стресів у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Спершу нами проведено кореляційний аналіз між маркерами метаболізму колагену та досліджуваними біохімічними показниками у щурів із

відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (табл. 4.18). Встановлено, що вміст вільного та пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові найбільш сильно корелює з рівнем ТФР- β 1. За цих умов зростання рівня ТФР- β 1 супроводжується зменшенням процесів деградації колагену та зростанням колагеноутворення. Менші за силою кореляції виникали між маркерами метаболізму колагену та рівнем прозапального цитокіну ФНП- α . Виявлено, що активація імунзапальних реакцій супроводжується посиленням деградації колагену та зменшенням біосинтетичних процесів.

Таблиця 4.18

Зв'язок між маркерами обміну колагену та показниками імунзапальних процесів, оксидативного та нітрозативного стресів у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (n=35).

Показники	Вільний оксипролін, мкмоль/л	Пептидозв'язаний оксипролін, мкмоль/л
ФНП- α , пг/мл	0,38*	-0,40*
IL-8, пг/мл	0,20	-0,25
VEGF, пг/мл	-0,15	0,21
ТФР- β 1, пг/мл	-0,45*	0,52*
ТБК-РП, мкмоль/л	0,10	-0,14
КГП, од.опт.щ/мг протеїна	0,39*	-0,35*
НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мл	0,20	-0,24
СОД, ум.од/мг протеїна	-0,15	0,10
МСМ, од.опт.щ.	0,13	-0,21
Нітроти та нітрати, мкмоль/л	0,35*	-0,38*

Примітка. * - достовірність коефіцієнту кореляції при $r > 0,33$ ($p < 0,05$).

Найменш міцні взаємозв'язки виявлено між рівнем оксипроліну та вмістом у сироватці крові карбонільних груп протеїнів і метаболітів нітро-

ген монооксиду. Так, посилення окисної модифікації протеїнів та нітрозативного стресу активують процеси катаболізму та зменшують синтез колагену.

У подальшому ми оцінили взаємозв'язки між маркерами ремоделювання кісткової тканини (активністю в сироватці крові кислої та лужної фосфатази) та активністю імунозапальних реакцій, ендотоксемії, нітрозативного та оксидативного стресів (табл. 4.19).

Таблиця 4.19

Зв'язок між біохімічними маркерами мінералізації кісткової тканини та показниками імунозапальних процесів, оксидативного та нітрозативного стресів у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (n=35).

Показники	Лужна фосфатаза, Од/л	Кисла фосфатаза, Од/л
ФНП- α , пг/мл	-0,45*	0,48*
IL-8, пг/мл	-0,42*	0,40*
VEGF, пг/мл	0,54*	-0,62*
ТФР- β 1, пг/мл	0,52*	-0,59*
ТБК-РП, мкмоль/л	-0,14	0,22
КГП, од.опт.щ/мг протеїна	-0,34*	0,35*
НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мл (X6)	-0,33*	0,36*
СОД, ум.од/мг протеїна	0,13	-0,12
МСМ, од.опт.щ.	-0,11	0,14
Нітроти та нітрати, мкмоль/л (X7)	-0,34*	0,37*

Примітка. * - достовірність коефіцієнту кореляції при $r > 0,33$ ($p < 0,05$).

Зафіксовано, що показники ремоделювання кісткової тканини виявляють найбільш міцні зв'язки з рівнем факторів росту VEGF та ТФР- β 1. Зростання в крові вмісту вказаних чинників асоційовано з індукцією остео-

генезу та зменшенням активності деструктивних процесів у кістковій тканині. Менші за силою зв'язки виникали між активністю фосфатаз та рівнем прозапальних цитокінів ФНП- α та IL-8 у сироватці крові. За цих умов посилення імунзапальних реакцій супроводжується активацією остеолітичних процесів. Найменші за модулем кореляції виникали між маркерами ремоделювання кістки та активністю продукції супероксидного аніону (НАДФН-оксидаза), окисної деградації протеїнів (КГП) і нітрозативного стресу (нітрити та нітрати).

Відомо, що кореляційний аналіз дає можливість характеризувати лише силу та напрямок зв'язку між двома змінними величинами, однак не виявляє причинно-наслідковий зв'язок. Для виявлення незалежних біохімічних показників, які дозволять спрогнозувати перебіг репаративного остеогенезу за умов перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу, ми застосували метод множинного лінійного регресійного аналізу. В якості можливих регресорів обрали біохімічні показники, які виявляли достовірні зв'язки з маркерами обміну колагену та ремоделювання кісткової тканини. До цих регресорів відносимо вміст у сироватці крові ФНП- α (X_1), IL-8 (X_2), VEGF (X_3), ТФР- $\beta 1$ (X_4), КГП (X_5), нітритів та нітратів (X_6) та активність НАДФН-оксидази (X_7). В якості критеріальної, залежної змінної Y нами введено умовний показник, який характеризує ступінь мінералізації кісткової тканини, названий нами прогнозованим індексом мінералізації (ПІМ). Оскільки в біологічних моделях існує висока інтерколінеарність регресорів, ми використали модель їх покрокового включення (Forward) у регресійне рівняння, тобто на кожному кроці до рівняння вводили найбільш інформативні показники, які мали високий за модулем парціальний коефіцієнт кореляції і збільшували коефіцієнт детермінації лінійного рівняння регресії. У результаті покрокового включення обраних регресорів у лінійне регресійне рівняння створено чотири моделі (табл. 4.20). Статистичний аналіз цих моделей прогнозування перебігу репаративного остеогенезу показав, що математична модель №4 найбільше відповідає такому виду прогнозування, адже краще описує дисперсію кри-

теріальної змінної Y (R^2 для моделі №4 суттєво вищий, ніж у інших моделей) та має меншу стандартну похибку оцінки. Це обумовило наш вибір моделі прогнозування перебігу остеорепації.

Таблиця 4.20

Статистична характеристика моделей прогнозування індексу мінералізації кісткової тканини у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Модель	R	R^2	Скоригований R^2	Стандартна похибка оцінки
№ 1	0,766 ^a	0,587	0,584	0,059
№ 2	0,831 ^b	0,690	0,688	0,058
№ 3	0,899 ^c	0,808	0,803	0,073
№ 4	0,929 ^d	0,863	0,856	0,030
a. Предиктори: (константа), X_4				
b. Предиктори: (константа), X_4 та X_3				
c. Предиктори: (константа), X_4 , X_3 та X_5				
d. Предиктори: (константа), X_4 , X_3 , X_5 та X_6				

Відповідно до математичної моделі №4 встановлено, що найбільш значущими та незалежними біохімічними показниками, які мають вагому роль для прогнозування перебігу репаративного остеогенезу, є наступні: X_3 – вміст у сироватці крові VEGF; X_4 - рівень у крові ТФР- $\beta 1$; X_5 - рівень у крові КГП; X_6 - рівень у крові нітритів та нітратів. Статистичну характеристику цих предикторів наведено в табл. 4.21. Установлено, що нестандартизовані коефіцієнти регресії моделі (В) є значущими та достовірними ($t > 2$, $p < 0,05$), а коефіцієнти парціальної кореляції – знаходяться на прийнятному рівні, що вказує на допустимий рівень інтерколінеарності змінних між собою.

Порівняння коефіцієнтів регресії β підтверджує відмінність унеску обраних предикторів у прогнозуванні перебігу репаративного остеогенезу. Встановлено, що за цих умов найбільш вагому роль в остеорепації відіг-

Таблиця 4.21

Характеристика регресорів, необхідних для прогнозування індексу мінералізації кісткової тканини у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Показники	β	B	Стандартна помилка B	t	p
X ₄ (ТФР- β 1)	0,456	0,065	0,007	12,25	0,0000
X ₃ (VEGF)	0,327	0,058	0,006	11,54	0,0000
X ₅ (КГП)	-0,210	-0,041	0,005	-12,35	0,0000
X ₆ (Нітрити та нітрати)	-0,156	-0,035	0,004	-10,85	0,0000

рає рівень у крові ТФР- β 1, дещо менше значення має вміст VEGF, найменше – рівню КГП, нітритів та нітратів. Отримані дані свідчать про те, що комплексне дослідження вмісту в крові вказаних біохімічних маркерів є необхідним для контролю за перебігом репаративного остеогенезу при переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Отже, проведені дослідження засвідчують вплив імунзапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів на регуляцію репаративного остеогенезу за умов даної експериментальної патології.

Результати досліджень, які представлені в цьому розділі дисертації, відображені в 2-х наукових статтях у фахових журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази Web of Science.

Goltsev AM, Lykhytskyi OO. The role of immune-inflammatory processes and oxidative stress in the mechanisms of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis. World of Medicine and Biology. 2017 Nov;4(62):132-6. [159]

Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis. World of Medicine and Biology. 2018 Jan;1(63):109-12. [160]

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ПЛАЦЕНТИ ТА КАЛЬЦІЮ ЦИТРАТ НА ІМУНОЗАПАЛЬНІ ПРОЦЕСИ, ОКСИДАТИВНИЙ І НІТРОЗАТИВНИЙ СТРЕСИ, ЕНДОТОКСЕМІЮ ТА СТАН КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ ІЗ ВІДКРИТИМ АНГУЛЯРНИМ ПЕРЕЛОМОМ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ НА ТЛІ ОСТЕОПОРОЗУ

У попередньому розділі обґрунтовано, що в регуляції репаративного остеогенезу у щурів із переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу важливу роль відіграють імунозапальні реакції, дисбаланс ростових факторів, оксидативний та нітрозативний стреси, порушення обміну кальцію та ін. Тому в якості коректорів нами обрано засоби, які здатні моделювати вказані біохімічні та імунологічні зміни. До них ми віднесли кріоконсервовану тканину плаценти та кальцій цитрат. Необхідність використання кальцію цитрат є патогенетично обґрунтованим, адже порушення обміну цього макроелементу зареєстровано на різних етапах репаративного остеогенезу у щурів із переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (розділ 4). Також кріоконсервована тканина плаценти має імуномодулюючі, протизапальні, антиоксидантні властивості, які стимулюють процеси репарації, що обумовлено унікальним вмістом у них біологічноактивних речовин (ростових факторів та інших цитомединів, природніх антиоксидантів, гормонів тощо) [20, 23]. Проте, на сьогодні відсутні дані щодо здатності кріоконсервованої тканини плаценти коригувати процеси остеорепарації. Тому мета цієї частини дослідження — оцінити вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на імунозапальні процеси, оксидативний та нітрозативний стреси, ендотоксемію та стан кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Досліди проведено на трьох групах тварин: 1 група (контроль)

- щурі з модельованим відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (ПНШ + ОП); 2 група - щурі з модельованою патологією, яким проведено імплантацію деконсервованих фрагментів плаценти (ПНШ + ОП+КП); 3 група - щурі з модельованою патологією, яким, крім імплантації деконсервованих фрагментів плаценти, додатково вводили кальцію цитрат (ПНШ + ОП+КП+Са). Дослідження проведено на 7, 14, 21, 30 та 45 добу після підсадки кріоконсервованої тканини плаценти. У сироватці крові оцінювали вміст ФНП- α , IL-8, VEGF, ТФР- β 1, ТБК-РП, КГП, нітритів та нітратів, активність НАДФН-оксидази, СОД, рівень загального кальцію, фосфатів, вільного та пептидозв'язаного оксипроліну, активність лужної та кислої фосфатаз, індекс мінералізації кісткової тканини.

5.1. Дослідження впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у сироватці крові прозапальних цитокінів і факторів росту в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Застосована терапія виявляє виразну протизапальну дію у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (табл. 5.1). Так, станом на 7 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти рівень ФНП- α в сироватці крові був вірогідно меншим на 12,2% порівняно з відповідним показником контрольної групи. Протизапальний ефект кріоконсервованої тканини плаценти значно посилювався при більш тривалому її застосуванні – станом на 14, 21 та 30 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти вміст ФНП- α в сироватці крові був відповідно на 17,4; 41,4 та 20,4% меншим, ніж відповідний показник у контрольній групі тварин. Поєднане застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат за умов експериментальної патології виявляє

більш виразний протизапальний ефект, ніж монотерапія. Доведено, що в 3 групі тварин станом на 14 добу рівень ФНП- α в сироватці крові був статистично вірогідно меншим на 23,9% порівняно з відповідним показником 2 групи. На усіх інших термінах експерименту рівень цього прозапального цитокіну в 3 групі був меншим, ніж в 2 групі, однак ці відмінності не досягали рівня статистичної вірогідності.

Таблиця 5.1

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у крові ФНП- α у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ФНП- α , пг/мл		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Са
7 доба	33,60 $\pm$ 2,74	29,50 $\pm$ 2,99*	28,80 $\pm$ 2,40*
14 доба	37,07 $\pm$ 4,45	30,60 $\pm$ 3,18*	23,30 $\pm$ 2,76* [#]
21 доба	41,49 $\pm$ 4,44 [#]	24,30 $\pm$ 2,99* [#]	23,02 $\pm$ 2,31* [#]
30 доба	29,83 $\pm$ 2,88 ^{#&}	23,75 $\pm$ 2,78* ^{#&}	22,50 $\pm$ 2,65* [#]
45 доба	24,10 $\pm$ 3,31 ^{#&}	23,00 $\pm$ 2,47 ^{#&}	21,80 $\pm$ 2,74 [#]

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного періоду дослідження.

Використання кріоконсервованої тканини плаценти та препарату ка-

льцію цитрат стримує наростання в сироватці крові ще одного прозапального цитокіну ІЛ-8 за умов експериментальної патології (табл. 5.2). Виявилось, що на 7 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти відсутні достовірні відмінності вмісту цього цитокіну порівняно з контролем. За більш тривалого використання кріоконсервованої тканини плаценти рівень ІЛ-8 у сироватці крові стає достовірно меншим, ніж у групі контролю. Так, станом на 14, 21 та 30 добу експерименту вміст ІЛ-8 був відповідно на 11,7; 29,3 та 18,4% меншим, ніж в 1 групі тварин. Комбіноване використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат помітніше стримує наростання рівня цього цитокіну в сироватці крові. Так, наприклад у 3 групі на 14 добу експерименту рівень ІЛ-8 був вірогідно меншим на 15,4%, порівняно з тваринами, які отримували монотерапію біоплацентою.

Таблиця 5.2

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у крові ІЛ-8 у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ІЛ-8, пг/мл		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Са
7 доба	26,50±2,89	25,20±2,89	24,80±3,38
14 доба	32,40±3,36 [#]	28,60±2,99* [#]	24,20±2,99* ^{\$}
21 доба	34,10±3,48 [#]	24,10±3,16* ^{&}	24,00±2,94*
30 доба	28,80±3,18 ^{&}	23,50±3,26* ^{&}	23,20±3,09*
45 доба	23,20±3,36 ^{&}	23,00±3,43 ^{&}	22,70±2,74

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Кріоконсервована тканина плаценти та кальцій цитрат спричиняють активацію процесів ангиогенезу у щурів із переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (табл. 5.3). Виявилось, що на 7 та 14 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти не зафіксовано достовірних змін рівня VEGF у сироватці крові порівняно з показником контрольної групи. У той же час за більш тривалого її використання відбулись достовірні зміни цього показника – станом на 21 та 30 добу рівень VEGF в сироватці крові виявився відповідно на 11,1 та 15,3% вищим відносно показників контрольної групи.

Таблиця 5.3

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у крові VEGF у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	VEGF, пг/мл		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	69,84±6,45	68,65±5,63	68,20±5,76
14 доба	70,58±8,41	69,90±7,08	82,50±6,71*#\$
21 доба	74,25±7,70	82,51±4,56*#&	96,39±5,59*#&\$
30 доба	82,54±7,21 ^{#&°}	95,19±5,12*#&°	98,76±6,54*#°\$
45 доба	64,90±6,30°	66,40±6,32&°	68,03±5,93&°

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. ° - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу;
5. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Поєднане застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцій цитрату більшою мірою стимулює процеси ангіогенезу за експериментальної патології. Доведено, що вже на 14 добу з'являються вірогідні відмінності вмісту VEGF у сироватці крові – його рівень на 16,9% перевищує відповідний показник контролю. Станом на 21 та 30 добу рівень VEGF у сироватці крові вірогідно вищий на 28,2 та 19,8% порівняно з відповідним показником контрольної групи тварин.

Застосування кріоконсервованої тканини плаценти та її комбінації з кальцієм цитрат з різною ефективністю стимулюють клітини остеобластичного диферону за умов модельованої патології (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у крові ТФР- β 1 у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопору в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ТФР- β 1, пг/мл		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	134,1 $\pm$ 11,6	135,0 $\pm$ 11,0	137,0 $\pm$ 11,8
14 доба	134,6 $\pm$ 13,8	139,0 $\pm$ 15,2	200,0 $\pm$ 12,5*#\$
21 доба	184,6 $\pm$ 7,9#&	213,6 $\pm$ 14,9*#&	252,4 $\pm$ 12,3*#&\$

Продовження табл. 5.4

30 доба	210,0±8,0 ^{#&}	258,9±14,8 ^{*#&}	260,0±12,1 ^{*#&}
45 доба	136,0±6,2	138,0±8,6	135,0±8,5 ^{&}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Використання кріоконсервованої тканини плаценти на початкових етапах експерименту (станом на 7 та 14 добу) не спричиняє достовірного впливу на вміст ТФР- β 1 у сироватці крові порівняно з групою контролю. Станом на 21 добу зафіксовано стимулюючий вплив кріоконсервованої тканини плаценти на процеси остеогенезу: за цих умов рівень ТФР- β 1 у сироватці крові на 15,7% перевищував відповідний показник контрольної групи. Через 30 діб після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти рівень цього цитокіну в сироватці крові досягав максимальних величин і був достовірно вищим (на 23,3%) відносно показника в контрольній групі тварин. Комбіноване використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат за умов перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу супроводжується значно більшим стимулюючим впливом на клітини остеобластичного диферону, ніж монотерапія кріоконсервованою тканиною плаценти. За таких умов активація остеогенезу спостерігалась на більш ранніх термінах: на 14 добу рівень ТФР- β 1 був достовірно вищим на 48,1% відносно такого показника в контрольній групі тварин. На більш пізньому терміні дослідження (станом на 21 добу експерименту) показник вмісту ТФР- β 1 у сироватці кро-

ві був достовірно вищими на 36,2%, відносно контролю та на 17,8% відносно показника в 2 групі. На 30 добу рівень цього фактора росту в сироватці крові залишався високим, але статистично достовірних відмінностей із показниками 1 та 2 груп не зареєстровано. Нормалізація вмісту ТФР- β 1 у крові спостерігалась на 45 добу експерименту.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що застосування кріоконсервованої тканини плаценти за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу стримує розвиток імунозапальних реакцій, стимулює процеси ангіогенезу та активує клітини остеобластичного диферону з максимальною активністю на 21-30 добу експерименту. У той же час за умов використання кріоконсервованої тканини плаценти в комбінації з кальцієм цитрат вказані ефекти стають більш виразними і фіксуються на більш ранніх термінах експериментального дослідження.

5.2. Оцінка впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на рівень в крові маркерів ендотоксемії, вільнорадикального окиснення та показників проантиоксидантної систем у різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Застосована терапія стримувала гіперактивацію вільнорадикального окиснення ліпідів, індуковану переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (табл. 5.5).

Так, на 7 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти рівень ТБК-РП у сироватці крові змінюється лише на рівні тенденції порівняно з показником в контрольній групі. Виразний вплив кріоконсервованої тканини плаценти на процеси ліпопероксидації зафіксовано лише на 14 добу, а його посилення – до 21 доби експерименту. За цих умов рівень ТБК-

Таблиця 5.5

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у крові ТБК-РП у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	ТБК-РП, мкмоль/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	5,200 $\pm$ 0,735	4,400 $\pm$ 1,323	4,129 $\pm$ 0,906*
14 доба	5,850 $\pm$ 0,955	4,580 $\pm$ 1,029*	4,147 $\pm$ 1,285*
21 доба	6,140 $\pm$ 1,078 [#]	4,050 $\pm$ 1,102*	3,850 $\pm$ 0,931*
30 доба	4,800 $\pm$ 1,176 ^{&}	3,740 $\pm$ 1,029	3,600 $\pm$ 0,980*
45 доба	3,450 $\pm$ 1,102 ^{&}	3,400 $\pm$ 0,906 ^{&}	3,320 $\pm$ 0,735

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження.

РП у сироватці крові на 21,7% менше (станом на 14 добу) та 34,0% менше (станом на 21 добу) порівняно з показниками контрольної групи. Пізніше (45 доба) рівень окисномодифікованих ліпідів у крові є низьким і достовірно не відрізняється від показників контролю. Імплантація деконсервованих фрагментів плаценти разом із кальцієм цитрат більш виразно впливає на процеси перекисного окиснення ліпідів. Так, у тварин 3 групи вже станом на 7 добу експерименту рівень ТБК-РП у сироватці крові вірогідно менший на 20,6% порівняно з контролем. У всі інші терміни дослідження у щурів 3 групи рівень вторинних продуктів ліпопероксидації є низьким, але статис-

тично значуще не відрізняється від відповідних показників 2 групи.

Уведення кріоконсервованої тканини плаценти та кальцій цитрат коригувало зміни процесів окисної модифікації протеїнів у щурів із моделюваною патологією (табл. 5.6). З'ясувалось, що застосування кріоконсервованої тканини плаценти помітно впливало на процеси перекисного окиснення протеїнів лише на 14 добу експерименту. За цих умов рівень КГП у сироватці крові був на 23,1% меншим, ніж у 1 групі тварин. Станом на 21 та 30 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти рівень КГП був статистично вірогідно меншим відповідно на 29,5 та 31,1% відносно таких показників на 14 добу дослідження, а також на 47,7 та 24,0% порівняно з відповідними показниками контролю. Використання комбінації кріоконсервованої тканини плаценти з кальцієм цитрат ефективно корегує процеси окисної деструкції протеїнів. Станом на 7 добу зафіксовано вірогідний вплив на активність пероксидації білків (за цих умов рівень КГП достовірно менший на 15,5% відносно контролю та 11,3% – порівняно з показником 2 групи). Збільшення тривалості застосування більш виразно впливає на перекисне окиснення протеїнів: станом на 14 добу експерименту вміст КГП у сироватці крові достовірно менший на 45,2% відносно контролю та 28,8% порівняно з показником 2 групи.

Таблиця 5.6

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст у крові КГП у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорузу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	КГП, од.опт.щ/мг протеїну		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Са
7 доба	69,60 $\pm$ 4,58	66,30 $\pm$ 3,04	58,79 $\pm$ 6,14* ^{\$}
14 доба	89,40 $\pm$ 4,78 [#]	68,80 $\pm$ 3,18*	49,00 $\pm$ 5,36* [#] ^{\$}

Продовження табл. 5.6

21 доба	92,80±5,83 ^{#&}	48,50±4,53 ^{*#&}	46,50±4,24 ^{*#}
30 доба	62,40±4,14 ^{&}	47,40±4,29 ^{*#&}	45,10±4,12 ^{*#}
45 доба	48,90±4,16 ^{&}	46,80±4,43 ^{#&}	43,20±3,77 [#]

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Поєднане використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат запобігають гіперпродукції супероксидного аніону за умов експериментальної патології (табл. 5.7). Доведено, що монотерапія кріоконсервованої тканини плаценти спричиняє достовірний вплив на активність НАДФН-оксидази лише на 14 добу експерименту: показник цього ферменту виявився на 6,8% меншим, ніж у контролі. Найбільший антиоксидантний ефект зафіксовано на 21 та 30 добу експерименту: активність НАДФН-оксидази в сироватці була відповідно на 32,0 та 24,2% меншою, ніж у контролі.

Використання кальцію цитрат у пропонованій терапії значно посилює депримуєчий вплив кріоконсервованої тканини плаценти на продукцію супероксидного аніону. Так, у 3 групі тварин вже на 7 добу дослідження активність НАДФН-оксидази була на 12,6% меншою, ніж у контролі. Станом на 14 добу активність цього ферменту була вірогідно меншою на 28,6% порівняно з контролем та 23,5%, відносно такого показника в 2 групі.

Кріоконсервована тканина плаценти та кальцій цитрат посилювали

Таблиця 5.7

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на активність НАДФН-оксидази в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мл		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	3,250±0,196	3,150±0,196	2,840±0,147*
14 доба	3,600±0,172 [#]	3,357±0,207*	2,570±0,245* ^{#\$}
21 доба	3,750±0,196 [#]	2,550±0,221* ^{##&}	2,500±0,171* [#]
30 доба	3,300±0,123 ^{&}	2,500±0,245* ^{##&}	2,460±0,196* [#]
45 доба	2,550±0,196 ^{&}	2,450±0,196 ^{##&}	2,400±0,220 [#]

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

інактивацію супероксидного аніону за участі СОД у щурів із переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (табл. 5.8). Застосування кріоконсервованої тканини плаценти не спричиняло достовірних змін активності цього ферменту на 7 добу експерименту відносно контролю. Натомість на 14 та 21 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти активність СОД була достовірно вищою на 18,1 та 65,7% порівняно з контролем.

Комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та каль-

Таблиця 5.8

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на активність СОД в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	СОД, ум.од./мг протеїна		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Са
7 доба	26,50±2,72	27,50±2,74	29,60±2,65
14 доба	20,40±2,99 [#]	24,10±2,82 ^{*#}	30,10±3,31 ^{*\$}
21 доба	17,80±3,14 [#]	29,50±3,55 ^{*&}	32,50±3,45 [*]
30 доба	26,60±3,31 ^{&°}	30,30±3,36 [*]	32,80±3,43 [*]
45 доба	29,88±3,33 ^{&°}	31,60±3,18 ^{#&}	33,30±3,63 [#]

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження.

4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

цію цитрат збільшує ефективність впливу монотерапії на процес інактивації супероксидного аніон радикалу. Установлено, що в 3 групі тварин активність СОД на 14, 21 та 30 добу була достовірно більшою відповідно на 47,5; 82,6 та 23,3%, ніж у контрольній групі і лише станом на 14 добу вірогідно перевищувала (на 24,9%) такий показник у 2 групі щурів.

Застосована терапія різною мірою стримувала розвиток нітрозативного стресу за умов модельованої патології (табл. 5.9).

Таблиця 5.9

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст метаболітів нітроген монооксиду в крові щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Нітрити та нітрати, мкмоль/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	120,0 $\pm$ 10,0	112,0 $\pm$ 9,2	101,0 $\pm$ 8,5*
14 доба	138,0 $\pm$ 10,3 [#]	120,0 $\pm$ 9,1*	99,77 $\pm$ 9,34* ^{\$}
21 доба	142,6 $\pm$ 13,5 [#]	103,0 $\pm$ 11,6* ^{&}	98,60 $\pm$ 10,04*
30 доба	121,0 $\pm$ 10,8 ^{&}	97,40 $\pm$ 11,41* ^{#&}	95,20 $\pm$ 9,26*
45 доба	99,34 $\pm$ 8,32 ^{&}	93,30 $\pm$ 11,15 ^{#&}	92,20 $\pm$ 9,92

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Імплантація деконсервованих фрагментів плаценти спричиняє вірогідне зменшення виразності нітрозативного стресу лише на 14 добу експерименту. За таких умов сумарний рівень нітритів та нітратів на 13,0% менший, ніж у групі контролю. Більш тривале використання кріоконсервованої тканини плаценти значно більше впливає на рівень метаболітів нітроген монооксиду. Так, станом на 21 та 30 добу встановлено достовірно менший вміст нітритів та нітратів у сироватці крові – відповідно на 27,9 та 19,5%,

відносно показників контрольних тварин. Найменший рівень стабільних метаболітів нітроген монооксиду в 2 групі зафіксовано саме на 45 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти, при цьому достовірних відмінностей цього показника з контролем не встановлено. Сумісне використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат суттєво впливає на процес нітрозативного стресу. Виявлено, що вже станом на 7 добу рівень нітритів та нітратів у сироватці крові на 15,8% менший, ніж у контрольній групі тварин. Ефективність впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на нітрозативний стрес зростала при більш тривалому їх уведенні. Доведено, що у 3 групі тварин сумарний вміст в крові стабільних метаболітів нітроген монооксиду станом на 14, 21 та 30 добу вірогідно менший відповідно на 27,7; 31,0 та 21,3% за показники в контролі і лише на 14 добу експерименту достовірно менший на 16,9%, ніж відповідний показник у 2 групі тварин.

Застосування кріоконсервованої тканини плаценти, особливо її комбінації з кальцієм цитрат, запобігає розвитку ендотоксемії у тварин із експериментальною патологією (табл. 5.10). Встановлено, що лише за 14 діб після застосування кріоконсервованої тканини плаценти реєструється вірогідно менший рівень МСМ – на 13,5% відносно контролю. На більш пізніх термінах використання кріоконсервованої тканини плаценти спостережено ще виразніше стримування ендотоксемії. Так, на 21 та 30 добу експерименту рівень МСМ у сироватці крові відповідно на 24,1 та 19,4% менший, ніж у контролі. Антитоксична дія кріоконсервованої тканини плаценти значно посилюється за умов її поєднаного введення з кальцієм цитрат. Так, наприклад рівень МСМ у 3 групі тварин станом на 14 добу статистично менший на 22,2% відносно контролю та 10,0% – порівняно з відповідним показником 2 групи щурів.

Отримані результати дослідження свідчать про те, що застосування кріоконсервованої тканини плаценти у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорузу стримує гіперактивацію віль-

Таблиця 5.10

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст МСМ у крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	МСМ, од.опт.щ.		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	0,160 $\pm$ 0,022	0,155 $\pm$ 0,021	0,150 $\pm$ 0,010
14 доба	0,185 $\pm$ 0,025 [#]	0,160 $\pm$ 0,012 [*]	0,144 $\pm$ 0,015 ^{*\$}
21 доба	0,196 $\pm$ 0,016 ^{#&}	0,149 $\pm$ 0,010 [*]	0,142 $\pm$ 0,015 [*]
30 доба	0,180 $\pm$ 0,015	0,145 $\pm$ 0,017 [*]	0,140 $\pm$ 0,020 [*]
45 доба	0,147 $\pm$ 0,020	0,137 $\pm$ 0,022 ^{&}	0,137 $\pm$ 0,012 [#]

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

норадикального окиснення ліпідів, окисної деструкції протеїнів, розвиток ендотоксемії та нітрозативного стресу, а також відновлює баланс у системі про-антиоксидантних ензимів. Вказані ефекти кріоконсервованої тканини плаценти виявлено лише на 14 добу спостереження, вони досягали максимуму на 21 добу експерименту. Поєднане застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат має більш виразні антиоксидантні, антинітрозативні та антитоксичні ефекти, які до того ж зафіксовано уже на 7

добу експерименту.

5.3. Дослідження впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на біохімічні показники метаболізму кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

Використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцій цитрат коригує метаболізм кальцію на різних етапах дослідження за умов експериментальної патології (табл. 5.11). Так, у 2 та 3 групах тварин станом на 7 добу експерименту рівень кальцію в сироватці крові достовірно менший відповідно на 15,7 та 14,9% порівняно з контрольною групою. На інших термінах дослідження встановлено зміну характеру впливу кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на обмін цього макроелементу на протилежний. Так, що на 21 добу дослідження зафіксовано достовірне зростання вмісту кальцію в крові на 30,4% (у 2 групі) та 46,7% (у 3 групі) відносно показників у контрольній групі. За цих умов на 14 добу рівень кальцію в 3 групі достовірно переважає на 12,5% показник у 2 групі тварин. На більш пізньому терміні дослідження (станом на 30 добу) виявлено максимальний вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на обмін кальцію: рівень цього макроелементу в 2 та 3 групах достовірно більший відповідно на 32,9 та 50,7% відносно показників контрольної групи. Проте, на цьому терміні дослідження не зафіксовано вірогідних відмінностей між показниками обміну кальцію в 2 та 3 групах. На 45 добу в 2 та 3 групах рівень кальцію в сироватці крові був найвищим, але вірогідних відмінностей відносно контрольної групи не встановлено.

Пропонована терапія стримувала формування позитивного фосфатного балансу у тварин із модельованою патологією, комбіноване застосуван-

Таблиця 5.11

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст загального кальцію в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Загальний кальцій, ммоль/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Са
7 доба	2,490±0,316	2,100±0,196*	2,120±0,147*
14 доба	1,760±0,367 [#]	1,740±0,163 [#]	1,775±0,100
21 доба	1,350±0,269 [#]	1,759±0,167*	1,975±0,134* ^{&\$}
30 доба	1,400±0,174 [#]	1,860±0,294* ^{&}	2,115±0,219* ^{&}
45 доба	2,180±0,367 ^{&}	1,980±0,367 ^{&}	2,150±0,269 ^{&}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження.

4. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

ня кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат суттєвіше впливає на обмін фосфору (табл. 5.12). Встановлено, що на 7 добу експерименту лише поєднане введення кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат сприяє вірогідному впливає на метаболізм цього макроелементу: в 3 групі рівень фосфатів у крові достовірно менший на 10,9% відносно контрольного показника. Тривале застосування супроводжується більш виразним депримуєчим впливом на обмін фосфору: станом на 14 та 21 добу рі-

вень фосфатів у крові тварин 2 та 3 груп достовірно менший – відповідно на 14,6 та 24,2%, ніж у контролі.

Таблиця 5.12

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст фосфатів в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Фосфати, ммоль/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	1,747 $\pm$ 0,126	1,630 $\pm$ 0,172	1,560 $\pm$ 0,196*
14 доба	1,980 $\pm$ 0,294	1,690 $\pm$ 0,221*	1,500 $\pm$ 0,294*
21 доба	2,150 $\pm$ 0,318 [#]	1,540 $\pm$ 0,269*	1,480 $\pm$ 0,220*
30 доба	1,810 $\pm$ 0,392	1,500 $\pm$ 0,221	1,450 $\pm$ 0,196*
45 доба	1,570 $\pm$ 0,367	1,480 $\pm$ 0,245	1,400 $\pm$ 0,245

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження.

Застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат запобігає надмірному катаболізму колагену за умов перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу (табл. 5.13). За таких умов саме поєднане застосування компонентів найбільш потужно впливає на процес деградації цього протеїну. За короткотривалої фармакотерапії (7 діб) зафіксовано найменший вплив на рівень вільного оксипроліну: в 2 та 3 групах рівень цього показника був достовірно меншим відповідно на 15,6 та 28,5% порівняно з контрольною групою. За цих умов рівень вільного оксипроліну в 3 групі був достовірно менший на 15,2% порівняно з 2 групою тварин. Більш три-

вале використання супроводжується виразнішим впливом на катаболізм колагену: станом на 14 та 21 добу рівень вільного оксипроліну в сироватці крові був меншим відповідно на 41,8 та 23,6% (у 2 групі), а також на 51,8 та 29,5% (у 3 групі) порівняно з контролем. У цей час зафіксовано вірогідні відмінності між показниками вільного оксипроліну 2 та 3 груп: станом на 14 добу в 3 групі рівень цього показника менше на 17,3%, а станом на 21 добу – на 7,7% відносно відповідних показників 2 групи тварин.

Таблиця 5.13

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст вільного оксипроліну в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Вільний оксипролін, мкмоль/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	35,80±1,62	30,20±1,81*	25,60±1,67* ^{\$}
14 доба	48,80±1,76 [#]	28,40±1,89*	23,50±1,69* [#] ^{\$}
21 доба	32,20±1,69 ^{#&}	24,60±1,69* ^{#&}	22,70±1,52* [#] ^{\$}
30 доба	26,80±1,32 ^{#&}	23,10±1,74* ^{#&}	22,10±1,81 [#]
45 доба	23,20±1,42 ^{#&}	22,40±1,62 ^{#&°}	21,10±1,47 ^{#&}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;

3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;

4. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Використання кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат посилює біосинтез колагену у тварин із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу, їх комбіноване застосування має найбільший вплив на цей процес (табл. 5.14).

Таблиця 5.14

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на вміст пептидозв'язаного оксипроліну в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Пептидозв'язаний оксипролін, мкмоль/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	27,40 $\pm$ 2,89	27,10 $\pm$ 2,74	27,50 $\pm$ 3,23
14 доба	28,80 $\pm$ 3,37	28,60 $\pm$ 3,48	36,95 $\pm$ 3,58* [#] \$
21 доба	33,21 $\pm$ 3,89 [#] &	40,31 $\pm$ 3,82* [#] &	44,89 $\pm$ 2,99* [#] &\$
30 доба	39,18 $\pm$ 4,19 [#] &	44,28 $\pm$ 2,55 [#] &	46,74 $\pm$ 3,74 [#] &
45 доба	28,10 $\pm$ 3,26	28,53 $\pm$ 3,45	29,32 $\pm$ 3,13 ^{&}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;
2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

На 7 добу дослідження кріоконсервована тканина плаценти та кальцій цитрат вірогідно не впливали на процес колагеноутворення. Натомість вже на 14 добу лише поєднане їх застосування посилювало біосинтезу колагену:

рівень пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові достовірно перевищує відповідно на 28,1 та 29,0% показники в 1 та 2 групі тварин. На 21 добу від початку фармакотерапії зафіксовано найбільш потужний вплив на процес синтезу колагену: вміст пептидозв'язаного оксипроліну в крові в 2 та 3 групах достовірно перевищує на 21,4 та 35,2% відповідні показники в контролі. За цих умов у 3 групі рівень цього метаболіту в сироватці крові був достовірно вищим на 11,4% порівняно з таким показником у 2 групі. На 30 добу після початку фармакотерапії в 2 та 3 групах зростання рівня пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові було меншим, ніж в попередньому терміні і становило відповідно 13,0 та 19,1% відносно контрольної групи.

Застосована фармакотерапія сприяла посиленню процесів остеогенезу за умов модельованої патології, комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат мало більший протективний ефект (табл. 5.15).

Таблиця 5.15

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на активність лужної фосфатази в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Лужна фосфатаза, Од/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Са
7 доба	460,0 $\pm$ 21,8	454,0 $\pm$ 22,3	462,0 $\pm$ 21,0
14 доба	464,0 $\pm$ 15,5	535,0 $\pm$ 18,6* [#]	556,0 $\pm$ 18,0* [#] \$
21 доба	535,0 $\pm$ 16,5* [#] &	594,1 $\pm$ 21,4* [#] &	595,0 $\pm$ 18,5* [#] &
30 доба	574,0 $\pm$ 22,6* [#] &	494,3 $\pm$ 23,7* [#] &	480,0 $\pm$ 17,3* [#] &
45 доба	465,0 $\pm$ 23,9	453,0 $\pm$ 22,3 ^{&}	448,0 $\pm$ 21,8 ^{&}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;

2. # - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. & - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. \$ - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Установлено, що на 7 добу активність процесів остеогенезу в дослідних групах статистично не відрізняється від контрольної групи. Найбільш потужний вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на процеси остеорепарації зареєстровано саме на 14 добу: в 2 та 3 групах активність лужної фосфатази в сироватці крові достовірно перевищувала відповідно на 15,3 та 19,8% показники в контрольній групі тварин. При цьому досліджуваний показник у 3 групі був достовірно вищим порівняно з таким у 2 групі. На 21 добу активність лужної фосфатази в 2 та 3 групах була вірогідно вищою відповідно на 11,0 та 11,2% порівняно з показниками контрольної групи тварин. На 30 добу в 2 та 3 групах активність цього ферменту була достовірно меншою відповідно на 16,8 та 19,3% відносно показників на 21 добу, а також на 14,0 та 16,4% порівняно з контролем. У дослідних групах тварин активність лужної фосфатази поверталась до рівня контрольних значень на 45 добу експерименту.

Використання кріоконсервованої тканини плаценти, особливо в комбінації з кальцієм цитрат, супроводжується депримуєчим впливом на процеси деструкції кісткової тканини за умов експериментальної патології (табл. 5.16). На 7 добу лише за умов комбінованої терапії активність кислої фосфатази була достовірно меншою на 11,3% відносно контролю. Найбільша протекторна дія зафіксована на 14 добу: в 2 та 3 групах тварин активність кислої фосфатази в сироватці крові достовірно менша відповідно на 12,7 та 22,8% порівняно з контролем. Варто зауважити, що саме в цей термін експерименту в 3 групі активність кислої фосфатази в сироватці крові

була вірогідно меншою на 11,5%, ніж у 2 групі тварин. Найменша активність кислої фосфатази в дослідних групах зафіксована на пізніх термінах дослідження (30-45 доба). Наприклад, на 30 добу в 2 та 3 групах активність цього ферменту була вірогідно меншою відповідно на 19,7 та 25,9% порівняно з показниками на 21 добу.

Таблиця 5.16

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на активність кислої фосфатази в крові щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Кисла фосфатаза, Од/л		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	16,75 $\pm$ 1,13	15,86 $\pm$ 1,31	14,90 $\pm$ 1,72*
14 доба	18,90 $\pm$ 1,52 [#]	16,55 $\pm$ 1,12*	14,64 $\pm$ 1,24* ^{\$}
21 доба	16,50 $\pm$ 1,84 ^{&}	14,82 $\pm$ 1,13 ^{&#}	14,72 $\pm$ 0,98*
30 доба	15,00 $\pm$ 0,59 ^{#&°}	12,22 $\pm$ 0,61 ^{*#&°}	11,80 $\pm$ 0,95 ^{*#&°}
45 доба	11,92 $\pm$ 1,43 ^{#&°}	11,08 $\pm$ 1,31 ^{#&°}	10,89 $\pm$ 1,50 ^{#&°}

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. [°] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 21 добу;
5. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Пропонована нами терапія сприяла посиленню процесів мінералізації

кісткової тканини за умов модельованої патології, найбільша ефективність спостерігалась при поєднаному застосуванні кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат (табл. 5.17).

Таблиця 5.17

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на індекс мінералізації у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу ($M \pm \delta$).

Строки дослідження	Індекс мінералізації		
	1 група (n=7) ПНЦ+ОП	2 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП	3 група (n=7) ПНЦ+ОП+КП+Ca
7 доба	27,57 $\pm$ 2,32	28,79 $\pm$ 2,73	31,29 $\pm$ 3,13*
14 доба	24,64 $\pm$ 1,45 [#]	32,43 $\pm$ 2,05* [#]	38,23 $\pm$ 3,67* [#] \$
21 доба	32,69 $\pm$ 2,97 ^{#&}	40,25 $\pm$ 3,00* ^{#&}	40,64 $\pm$ 3,76* [#]
30 доба	38,29 $\pm$ 2,08 ^{#&°}	40,53 $\pm$ 2,53 ^{#&}	40,94 $\pm$ 4,07 [#]
45 доба	39,38 $\pm$ 3,85 ^{#&°}	41,26 $\pm$ 4,23 ^{#&}	41,64 $\pm$ 4,44 [#]

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників 1 групи тварин відповідного терміну дослідження;
2. [#] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 7 добу дослідження;
3. [&] - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно показників на 14 добу дослідження;
4. ^{\$} - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп відповідного терміну дослідження.

Ранній вплив на процеси мінералізації спостережено лише за умов комбінованої терапії: на 7 добу індекс мінералізації був вірогідно вищим на 13,4% відносно контролю. Найбільш потужна мінералізуюча дія кріоконсервованої тканини плаценти та кальцій цитрату зафіксовано саме на 14 добу

дослідження: в 2 та 3 групах тварин індекс мінералізації статистично значуще перевищував на 31,7 та 55,3% показники в контрольній групі. За цих умов (14 доба) у тварин 3 групи цей показник був достовірно більшим на 17,9%, ніж у 2 групі. На 21 добу в 2 та 3 групах індекс мінералізації вірогідно вищий відповідно на 23,2 та 24,2% відносно контролю.

Отже, отримані результати свідчать про остеопротекторну дію кріоконсервованої тканини плаценти за умов модельованої патології, яка виявляється в посиленні процесів колагеноутворення (максимум на 21 добу), мінералізації кісткової тканини (максимум на 14 добу), а також депримує чому впливі на остеодеструктивні процеси (максимум на 14 добу) та катаболізм колагену (максимум на 14 добу). Комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат має більш потужну остеопротекторну дію, яка до того ж спостерігається на більш ранніх термінах експерименту, ніж за умов монотерапії.

Результати досліджень, які представлені в цьому розділі дисертації, відображені в науковій статті у фаховому журналі, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus, та тезах науково-практичної конференції:

Likhitskyi OO, Goltsev AM. Influence of Cryopreserved Human Placental Tissue on Reparative Bone Formation in Rats with the Lower Jaw Open Fracture on Osteoporosis Background. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019 Jun;29(2):125-36. [161]

Likhitskyi OO. Efficiency of Combined Use of Cryopreserved Human Placenta Tissue and Calcium Citrate on Metabolism in Bone Tissue of Rats with Mandible Fracture on Background of Osteoporosis. In журнал «Problems of Cryobiology and Cryomedicine» 2018 Jul; 2(Vol. 28, p. 177). Kharkiv. [183]

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз наукових джерел засвідчує, що наразі запропоновано теоретично обґрунтовано і клінічно апробовано велику кількість методик стимуляції репаративної остеорегенерації після переломів нижньої щелепи [82, 136, 144, 148, 163, 195, 216]. При застосуванні терапевтичних стратегій лікування нижньощелепних переломів недостатньо враховано факт сповільнення репарації кісткового дефекту при остеопорозі, в результаті чого продовжується термін реабілітації пацієнтів у післяопераційний період, підвищується рівень матеріальних витрат на хірургічні і стоматологічні послуги, збільшується кількість днів непрацездатності [11, 32, 76, 172, 185].

Досі не було отримано доказів безпечності і біоаналогічності стимуляторів кісткової репарації для людини. Екстраполяція позитивних результатів спостережень дії більшості препаратів в експериментальних дослідженнях на фізіологію людини є в багатьох аспектах небезпечною. Це пов'язано з тим, що дозування досліджених на тваринних моделях препаратів не придатні для застосування у людини. Крім того, переломи у тварин загоюються швидше, побічні ефекти використання ліків для людини і тварин відрізняються [135, 142, 154].

Постає питання пошуку препаратів, які б стимулювали аналогічне для людини загоєння перелому і які у перерахунку на людину були б нижче мінімальних тератогенних і токсичних доз, використаних на тваринних моделях [142]. Ураховуючи всю широту спектра і каскад біохімічних, гістологічних змін, що супроводжують процес остеорепації на тлі остеопорозу, необхідні безпечні препарати з широким діапазоном тривалих біологічних ефектів [145, 164, 166].

Цим вимогам відповідають тканинні препарати, що застосовуються при лікуванні травматичних ушкоджень кісток і прискорюють утворення

кісткового мозоля [25, 140, 171, 187]. За даними гістологічного дослідження, препарати кріоконсервованої тканини плаценти активно впливають на швидкість утворення остеобластів і перехід їх в остеоцити [13, 174, 192]. Дослідженнями продемонстровано, що застосування біоеквівалентних доз таких препаратів зумовлює формування кісткового мозоля у піддослідних тварин на 10-12 днів раніше, ніж в групі контролю. До того ж процес загоєння кістки перебігає з мінімальними ускладненнями та побічними ефектами чи без них узагалі [7, 217].

Для точного визначення про регенераторних можливостей тканинної терапії при відновленні кісткових дефектів необхідно послідовно проводити експериментальні випробування під контролем інформативних клінічних, лабораторних та морфологічних методів дослідження, що дозволяють у динаміці оцінити ступінь вираженості і спрямованість регенераторних процесів [169, 189].

Метою нашого дослідження було обґрунтування можливостей застосування кріоконсервованої тканини плаценти в якості коректора репаративного остеогенезу в умовах розвитку експериментального травматичного процесу в кістці нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Для досягнення поставленої мети застосовано метод експериментального моделювання. З-поміж моделей обрано перелом нижньої щелепи щура в асептичних умовах, щоб запобігти інфікуванню і як найбільш наближену до клінічної практики і адекватну поставленому завданню.

Досліджувані тварини розподілено на такі групи: група 1 – контроль (змодельований остеопороз + перелом нижньої щелепи); група 2 – (змодельований остеопороз + перелом нижньої щелепи + імплантація деконсервованих фрагментів плаценти); група 3 – (змодельований остеопороз + перелом нижньої щелепи + імплантація деконсервованих фрагментів плаценти у сполученні з кальцієм цитрат).

Підкреслимо, що перелом здійснювався відкритим способом, проте за своїм перебігом він відповідав більше закритому, з огляду на відсутність

характерного для відкритого ангулярного перелому інфікування зони пошкодження. Експериментальна модель перелому нижньої щелепи зі стабільною фіксацією дозволила оцінити ефективність дії кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на відновлювальні процеси.

Показники, що характеризують динаміку репаративних процесів, які відбувалися в асептичних умовах загоєння перелому кістки, служили контролем для наступних серій експериментів із застосуванням препаратів, що поліпшують і прискорюють репаративний остеогенез.

Установлено, що при переломі запускається послідовний каскад реакцій тканин, спрямованих на видалення дрібних осколків кістки і пошкоджених структур, реорганізацію, васкуляризацію і побудову нової кісткової тканини, що з'єднує кісткові уламки, і на формування кістки як органу [101, 108, 185].

Перелом розцінюють як незрощений, якщо протягом 6 місяців відсутні рентгенологічні ознаки загоєння або не спостерігається позитивна динаміка репарації протягом 1,5-3 місяців. При уповільненому загоєнні перелому відновлення пошкодженої кістки в звичайні терміни не відбувається. Формується первинний мозоль, але не відбувається його дозрівання і ремоделювання в призначені терміни [18, 189].

Процес загоєння перелому кістки проходить фазу запалення, репарації, ремоделювання. Тривалість фаз та аналіз ступеня їх прояву на цифрових мікрофокусних рентгенограмах дозволяє оцінити динаміку поліпшення показників репаративної регенерації [32, 135].

Зіставлення даних *рентгенографічних досліджень*, проведених у динаміці, виявило загальні закономірності у перебігу репаративного процесу. Це первинна тканинна реакція у вигляді остеопору, вторинно розвинене запалення у вигляді деструктивних змін, частіше в дистальному уламку щелепи і по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця, резорбція альвеолярного відростка з оголенням коренів зубів і періоститом. Спостерігалися також відмежування вогнища деструкції в уламках щелепи і

ділянках резорбції альвеолярного відростка. Про це свідчить чіткість країв і збільшення площини кістки на межі деструктивних ділянок, ознаки остеосклерозу, а також відмежування секвестрів і зменшення реакції періосту.

Пізніше проявилися ознаки консолідації уламків щелепи у вигляді збільшення щільності кістки, зменшення інтенсивності просвітлення і ширини щілини перелому, чіткості зображення контурів уламків, а також наявності в зоні пошкодження періостальних нашарувань, з'єднуючих уламки. Процес консолідації уламків щелепи завершився зникненням лінії перелому і утворенням кісткового мозоля.

Описані закономірності рентгенологічних проявів остеогенеза в кожній серії експерименту спостерігалися в різні терміни і мали різний ступінь вираження.

Первинну тканинну реакцію кістки у *всіх трьох* серіях зафіксовано на *7 добу* експерименту у вигляді остеопорозу в кінцевих відділах уламків.

Характерною рентгенологічною ознакою гнійного запалення, руйнування і некротизації кістки є нерівка окресленість, розмитість її країв із дрібними кістковими секвестрами в центрі, потовщенням окістя (періостальна реакція) з утворенням запальних екзостозів. Остеопороз швидко і різко наростає, щілина перелому в динаміці все більше і більше розширюється. Отже, зазначені патологічні процеси сповільнюють відновне кісткоутворення [100].

У дослідженні запальні зміни у вигляді явищ деструкції та секвестрації, а також виражена періостальна реакція спостерігалися лише в *контрольній* серії.

Повторні контрольні дослідження дозволили визначити питому вагу запальних і репаративних явищ у процесі загоєння. Наявність деструктивних вогнищ і секвестрів, особливо їх кількість та місце розташування, точно встановлено на підставі даних рентгенологічного дослідження, у зв'язку з

чим останнє при переломах нижньої щелепи набуває особливо важливого значення [12].

До **14 доби** в *контрольній* серії тварин наростали явища запалення у вигляді остеопорозу, деструкції, секвестрування і періоститу. У ті ж терміни в *другій* серії експерименту ці ж явища були виражені меншою мірою, а в *третій* серії – до цього часу з'явилися ознаки консолідації у вигляді ущільнення кінцевих відділів уламків. Ознак секвестрації та деструкції у третій серії досліду не виявлялося.

До **21 доби** в *контрольній* серії експерименту, разом із наростаючою запальною реакцією у вигляді великої деструкції, секвестрації та вираженого періоститу, зафіксовано ділянки остеосклерозу в кінцевих відділах уламків, що свідчить про ослаблення запального процесу. У *другій* серії експерименту в ті ж терміни явища періоститу були виражені несуттєво, а ділянки деструкції і секвестри вже чітко відмежовані за рахунок остеосклерозу. У *третій* серії до 21 доби спостережено збільшення щільності кінцевих відділів уламків, лінія перелому визначалася лише в нижніх відділах щелепи. Зафіксовано періостальні нашарування, що з'єднують уламки. Остеопороз виявлявся лише у вигляді вогнищ у кінцевих відділах уламків. Все це свідчить про ефективний вплив на консолідацію уламків щелепи комплексу лікувальних заходів, застосованого в третій серії експерименту.

До **30 доби** в *контрольній* серії за рахунок ділянок прогресуючого остеосклерозу виокремились поля деструкції і секвестрів. Періостальна реакція була помірною. У *другій* серії в ті ж терміни превалювало явище ущільнення кістки, періостальна реакція була виражена несуттєво. Секвестрації не було. Все це вказувало на початок консолідації уламків нижньої щелепи у тварин другої експериментальної групи. У *третій* серії досліду до 30 доби зафіксовано явища консолідації уламків у вигляді ущільнення кістки, розмитості контурів, періостальних нашарувань, що з'єднують уламки. Лінія перелому не простежувалась.

До **45 доби** в *контрольній* серії зменшувалася щільність секвестрів, спостерігалось їх обмеження за рахунок вираженого остеосклерозу в кінцевих відділах уламків. У *другій* серії в ті ж терміни визначено явища консолидації уламків, зростання ущільнення в кінцевих відділах, зменшення інтенсивності просвітлення і ширини лінії перелому. Періостальна реакція була помірною. У *третьій* серії до 45 доби на місці лінії перелому визначався щільний кістковий мозоль.

Запалення в ділянці пошкодження тканин є пусковим механізмом регенерації кісткової тканини і спрямоване на боротьбу з інфекцією, усунення загиблених тканин. Ці тканини продукують біологічно активні речовини, під впливом яких розширюються дрібні судини, прискорюється капілярний кровообіг і підвищується проникність капілярів. Із розширених судин у навколишні тканини потрапляє багатий білками трансудат, починається еміграція лейкоцитів. Чим триваліший період нейтрофільної стадії запалення, тим гірше для регенерації, оскільки нейтрофіли фагоцитують лише пошкоджені, а не мертві клітини [10, 16, 112].

Відомо, що за відсутності або при зменшенні гнійно-некротичних процесів активізуються процеси формування грануляційної тканини, зменшується лейкоцитарна інфільтрація, зріла кісткова тканина заміщує незрілу, зруйновані клітини виділяють остеоїд (позаклітинний матрикс), який мінералізується з утворенням кісткових трабекул (балок). При формуванні нової кісткової тканини в ділянці кісткового мозоля знаходяться остеокласти. Під час загоєння і диференціювання остеокластів осколки кістки заміщуються зрілою пластинчастою кісткою, а трабекули мозкової речовини розширюються [112].

Пусковим механізмом репаративної регенерації є резорбція кінців уламків і вивільнення остеоіндукторів – морфогенетичних білків кістки, які впливають на індуцібельну систему (поліпотентні клітини, перицити). Ці клітини перетворюються в препреостеобласти, які в результаті проліферації створюють величезну кількість остеобластів, що будують кістку на місці

пошкодження. Поліпотентні клітини можуть диференціюватися за остеогенним, хондрогенним або фіброгенним шляхами [192].

Диференціація в остеогенні клітини (переважання остеогенного компонента) прямо залежить від оксигенації тканин, тобто від ступеня відновлення мікроциркуляторної мережі в місці перелому. При швидкому відновленні мікроциркуляції в зоні перелому кісткові балочки енергійно ростуть уздовж капілярів від кожного уламка назустріч один одному і з'єднують їх – відбувається нормальна консолідація уламків за ангіогенним типом. Таким чином, при нормальному зрощенні максимум змін в уламках відбувається в перший тиждень [129, 130].

Зіставлення динаміки морфогенезу регенерату *за даними гістологічних досліджень* його компонентів у першій контрольній та у другій і третій дослідних серіях показало, що на фоні загальних закономірностей є чітко виражені особливості.

Установлені загальні закономірності виявлялися в тому, що у всіх трьох серіях у морфогенезі регенерату визначено фазу некротичних змін із первинною тканинною реакцією у вигляді утворення грануляційної тканини і лейкоцитарної інфільтрації. На тлі відмежування секвестрів у грануляційній тканині та поза її межами розвивалася друга фаза остеогенезу – поява мережі новоутворених балочок. У третій фазі на цьому ж фоні та за відносно стабільного стану грануляційної тканини визначалась виражена перебудова полів новоутвореної кістки з трансформацією дрібнопетлистої мережі кісткових балочок у крупнопетлисту і формуванням місцями кортикального шару з компактної кісткової тканини. Зауважимо, що морфологічні особливості зубного ряду нижньої щелепи білого щура в умовах моделі зумовлювали значне пошкодження 4-го зуба і утворення виражених зон некрозу і секвестрації.

У першій (*контрольній*) серії наведені вище особливості призводили до виникнення великих ділянок вторинних некротичних змін, значної лейкоцитарної інфільтрації, слабкого розвитку грануляційної тканини та мере-

жі новоутворених кісткових пластинок, а на 45 добу в центральних ділянках кісткових уламків нижньої щелепи виявляли осередки секвестрування і некрозу, повного зрощення відростків не відбувалося. Наголосимо, що у *контрольній* групі грануляційна тканина була найбільш активним компонентом регенерату в усі терміни його формування і відмежовувала поля лейкоцитарної інфільтрації і секвестри, але остеогенний компонент не отримав переважного розвитку. Отже, до кінцевого терміну спостереження відновлення цілісності нижньої щелепи не відбувалося через відсутність в морфогенезі регенерату закономірної зміни структури, що уповільнювало процес перебудови.

У *другій* і *третьій* серіях дія застосований нами комплекс кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат суттєво змінював морфогенез регенерату.

Так, у *другій* серії визначено значне зменшення обсягу некротичних змін, лейкоцитарної інфільтрації та посилення інтенсивності остеогенезу. На відміну від першої серії виявлено численні ділянки остеогенезу на поверхні збережених і безостеоцитних фрагментів компактної кісткової тканини. Крім того, кріоконсервована тканина плаценти стимулювала формування провізорних тканин на окремих ділянках регенерату з 14 до 21 доби. Все це зумовило швидке розмежування ділянок некрозу і секвестрів та формування до 30 доби полів новоутвореної кісткової тканини у вигляді дрібнопетлистої мережі, кісткових балочок, за рахунок якої відбувалося зрощення фрагментів щелепи. Отримані результати підтверджують стимулюючу дію імплантації деконсервованих фрагментів плаценти, виражену більшою мірою на пізніх стадіях регенерації, переважання активності остеогенного компоненту при зрощенні фрагментів ушкодженої кістки за рахунок мережі дрібнопетлистих кісткових пластинок, що полягає в збільшенні площі новоутвореної кісткової тканини в зоні пошкодження в порівнянні з контрольною групою.

У *третьої* серії при переломі з імплантацією деконсервованих фрагментів плаценти та введенням кальцію цитрат вже на 7 добу встановлено суттєве зменшення обсягу некротичних ділянок та тлі вираженого збільшення полів новоутвореної кісткової тканини. Особливо важливим є тісне зрощення полів новоутвореної кісткової тканини і збережених фрагментів компактної кістки. Поля новоутвореного регенерату трансформувалися в крупнопетлисту і компактну кісткову тканину на 21 добу, і вже до 30 доби зафіксовано повне зрощення фрагментів. Зауважимо, що протягом усього спостереження остеогенний компонент переважав над фіброгенним, про що свідчить про більш інтенсивність процесів остеогенезу і зрощення фрагментів вже до 30 доби. До 45 доби експерименту за рахунок трансформації регенерату сформовано новоутворений кортикальний шар. Отже, дія комплексу застосованої нами кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат істотно вплинула на морфогенез регенерату кістки нижньої щелепи. Одночасне їх застосування значно зменшує площі некротичних змін у зоні пошкодження і інтенсифікує остеогенез. Все це обумовлює швидке розмежування ділянок некрозу і формування до 21 доби полів новоутвореної кісткової тканини у вигляді дрібнопетлистої мережі кісткових трабекул, за рахунок чого відбувається зрощення країв перелому. Також формується компактна кістка.

Наслідком механічної травми є глибокі порушення клітинної ланки імунітету у вигляді пригнічення експресії CD2-DR + рецепторів і зниження абсолютної кількості клітин із фенотипами CD4 + і CD8 + [143].

Метаболізм кісткової тканини при пошкодженні забезпечують численні цитокіни: IL-1 (інтерлейкін), IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, TNF-а (фактор некрозу пухлин), TNF-б, колонієстимулюючі чинники, лейкоз-інгібуючий фактор, INF- g (інтерферон), TGF-В (трансформуючий фактор росту) [119, 179].

С. Е. Золотухін і співавт. [42] встановили, що порушення в ланках імунної системи у щурів із переломом нижньої щелепи залежать від дина-

міки і типу перебігу посттравматичної реакції. Визначено лімфоцитарну недостатність, пригнічення фагоцитозу і гіперцитокінемію із зсувом балансу цитокінів в бік прозапальних факторів.

Вивчення імунологічних реакцій крові при пошкодженні кісткової тканини дозволяє оцінити її взаємозв'язок із перебігом остеогенезу. Це актуально як для прогнозування запальних ускладнень, так і для оцінки результатів оперативного та консервативного лікування постраждалих [41].

Показники ендогенної інтоксикації відображають морфологічні аспекти ушкоджень, стан реактивності і резистентності організму, а також якість та обсяг наданої медичної допомоги [71].

Перекисне окислення ліпідів, ініційоване ендогенними патогенами, є компонентом біологічної реакції запалення. У свою чергу, порушення окислювально-відновного балансу призводить до розвитку ендотоксикозу. Поява ендогенних субстанцій, речовин низької і середньої молекулярної маси та продуктів білкового розпаду олігопептидів характеризує ступінь метаболічної відповіді організму на травму [72].

Нітрозативний і оксидативний стреси при переломах переважно виявляються одночасно. Більш високі концентрації NO провокують в організмі нітрозативний і оксидативний стреси, які виснажують антиоксидантний захист і порушують механізми, репаруючі кісткову тканину [3].

Визначення біохімічних маркерів метаболізму кісткової тканини дозволяє оцінити стан кістки, встановити швидкість обмінних процесів у кістковій тканині при переломах. Біохімічні маркери формування і резорбції кістки характеризують функції остеобластів і остеокластів в процесі її ремоделювання [71].

Експериментальними дослідженнями доведено, що вільна фракція гідроксипроліну, яка утворюється при розпаді колагену, не може бути повторно включена в метаболічні процеси на відміну від інших амінокислот. Тому відхилення від нормальних величин концентрації вільної фракції гідроксипроліну свідчить про катаболізм колагену, тобто вона є біохімічним мар-

кером резорбції кісткової тканини, оскільки основним білком цієї тканини є колаген [71, 115]. Разом із збільшенням концентрації вільної фракції гідроксипроліну (біохімічного маркера резорбції кісткової тканини) знижується вміст протеїн зв'язаної фракції цієї амінокислоти – пептидозв'язаного оксипроліну (біохімічний маркер синтетичної фази метаболізму колагену) [102].

Відомо, що підвищення активності остеобластів при переломах кісток, збільшує рівень лужної фосфатази в крові [61]. Лужна фосфатаза необхідна для того, щоб в організмі на молекулярному рівні успішно відщеплювався фосфат від органічних речовин. Вона бере важливу участь в мінералізації кістки, формуванні апатитів і органічного матриксу. Динаміка показників лужної фосфатази пов'язана з прогнозуванням перебігу переломів кісток лицевого скелета [41]. Підвищення в динаміці активності лужної фосфатази є позитивною прогностичною ознакою клінічного перебігу та консолідації уламків. Лужна фосфатаза підвищується відразу після травми (за рахунок пошкодження кістки), зберігається на весь час зрощення перелому (за рахунок активізації остеобластів) і за умови ефективної репарації поступово зменшується до нормальних значень [27].

Значна кількість кислої фосфатази знаходиться в остеокластах і секретується ними в позаклітинне середовище під час резорбції. Оскільки активність кислої фосфатази в сироватці крові зростає при станах, що характеризуються посиленням процесу резорбції кістки, а також встановлена кореляція між її активністю і даними гістоморфометрії, показники кислої фосфатази використовують для визначення вираженості резорбтивних (деструктивних) процесів у кістці [115, 178]. Підвищення рівня кислої фосфатази зумовлюють розвиток запального процесу внаслідок перелому і збільшення активності остеобластів за рахунок стресу [41].

Спочатку ми оцінили рівень показників імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів в сироватці крові, а також маркери метаболізму кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи

на тлі остеопорозу. Досліди проведено на двох групах тварин: 1 група (контроль) – псевдооперовані щурі (ПО); 2 група (дослід) – щурі з модельованим відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (ПНШ + ОП). Дослідження проводили на 7, 14, 21, 30 та 45 добу після моделювання перелому. Доведено, що у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу спостерігається низка метаболічних та імунологічних змін.

Станом на 7 добу встановлено зростання активності імунозапальних реакцій, доказом чого є вірогідне підвищення вмісту в сироватці крові прозапальних цитокінів ФНП- α та IL-8 відповідно на 58,5 та 25,4% відносно контролю. ФНП- α та IL-8 активують хемотаксис нейтрофілів і моноцитів / макрофагів до ділянки пошкодження, посилюють їх адгезію до клітин ендотелію, створюють умови для гуморально-клітинної кооперації клітин крові і кісткової тканини та розвитку запальної реакції [43]. Також зафіксовано активацію вільнорадикального окиснення ліпідів (вміст ТБК-РП у сироватці крові зростає на 60,0% порівняно з показником контролю; $p < 0,05$), окисну деструкцію протеїнів (рівень КГП у сироватці крові зростає на 54,0% відносно контролю; $p < 0,05$). Зростання активності процесів перекисного окиснення ліпідів та протеїнів розвивається на тлі дисбалансу в системі проантиоксидантних ензимів. За цих умов збільшується продуктивність супероксидного-аніон радикалу (активність НАДФН-оксидази – на 35,4% відносно контролю; $p < 0,05$) та зменшується активність його інактивації за участі СОД на 18,7% порівняно з контрольною групою. На цьому терміні репаративного остеогенезу гіперактивується нітрозативний стрес (рівень нітритів та нітратів у сироватці крові зростає на 30,2% порівняно з контрольною групою; $p < 0,05$), що, ймовірно, пов'язано з індукцією індукцибельної ізоформи NO-синтази під впливом прозапальних цитокінів [73]. Імунозапальні реакції, оксидативний та нітрозативний стреси розвиваються на тлі наростаючої ендотоксемії, про що доказово свідчить збільшення рівня МСМ у сироватці крові на 23,1% відносно контрольного показника.

Біохімічні та патофізіологічні порушення, які виникають в цей термін репаративного остеогенезу, супроводжуються порушенням метаболізму кісткової тканини. За цих умов вірогідно зростає рівень кальцію в сироватці крові на 19,7% порівняно з показником контролю, що ймовірно є наслідком посилення деструкції неорганічного матриксу кісткової тканини [102]. Також статистично вагомо збільшується рівень фосфатів у крові на 24,8% відносно контролю, що можна пояснити зростанням активності фосфатаз у сироватці крові [27]. На цьому етапі остеорепарації зафіксовано руйнування органічного матриксу кісткової тканини, активізація катаболізму колагену (вміст в сироватці крові вільного оксипроліну зростає на 59,8% відносно контролю). Процеси остеолізу відбуваються на тлі активації остеокластів, доказом чого є статистично значуще збільшення активності кислої фосфатази в сироватці крові на 68,7% порівняно з контрольною групою. Деструкція кісткової тканини супроводжується вірогідним зменшенням індексу мінералізації кісткової тканини на 39,4% відносно контролю. Таким чином, на цьому етапі репаративного остеогенезу досить активними є процеси резорбції кісткової тканини, руйнування неорганічного та органічного матриксу кісткової тканини, які розвиваються на тлі імунзапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів.

Станом на 14 добу експерименту вірогідно зростають імунзапальні реакції (рівень IL-8 вірогідно вищий на 22,3% відносно показника на 7 добу). Посилюється активність вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів (вміст ТБК-РП та КГП перевищує відповідно на 12,5 та 28,5% показники на 7 добу; $p < 0,05$). Одночасно зростає дисбаланс у системі проантиоксидантних ензимів (активність НАДФН-оксидази достовірно вища на 10,8%, а СОД – менша на 23,0% відносно показників на 7 добу). Інтенсивність нітрозативного стресу та ендотоксемії є достовірно вищою порівняно з попереднім терміном дослідження (рівень нітритів та нітратів, а також МСМ у сироватці крові відповідно на 15,0 та 15,6% більший порівняно з показниками на 7 добу експерименту; $p < 0,05$). На тлі поглиблення імунза-

пальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів зростає масштабність змін метаболізму кісткової тканини. За цих умов зафіксовано подальше зростання рівня фосфатів у крові (на 36,5% перевищує показник контролю; $p < 0,05$). Значно посилюються процеси остеодеструкції (активність кислої фосфатази вірогідно вища на 12,5% порівняно з показником на 7 добу) та катаболізму колагену (рівень вільного оксипроліну на 36,3% перевищує показник станом на 7 добу; $p < 0,05$). Мінеральна щільність кісткової тканини прогресивно зменшується (індекс мінералізації на 10,9% менший, ніж на 7 добу; $p < 0,05$).

Станом на 21 добу експерименту активність імунозапальних реакцій є високою і відповідає показникам на 14 добу (рівень прозапальних цитокінів ФНП- α та IL-8 у сироватці крові статистично вірогідно не відрізняється від показників станом на 14 добу). Процеси ліпопероксидації та окисної деструкції протеїнів мають приблизно таку ж інтенсивність, як і в попередньому терміні репаративного остеогенезу (рівень ТБК-РП та КГП вірогідно не відрізняється від показника на 14 добу). Активність нітрозативного стресу та ендотоксемії також практично не відрізняється від показників на 14 добу експерименту. Одночасно зростає інтенсивність ангіогенезу, доказом чого є вірогідне збільшення вмісту VEGF у сироватці крові на 12,8% відносно контрольного показника [30]. Також активуються клітини остеобластичного диферону, про що доказово свідчить статистично достовірне збільшення вмісту ТФР- $\beta 1$ у сироватці крові на 46,5% відносно контролю. TGF $\beta 1$ посилює проліферацію остеобластів та синтез колагену, індукує диференціювання мезенхімальних клітин в остеобласти і хондроцити, є стимулятором регенерації переломів кісток скелета [101]. Цей цитокін також залучений до процесів ангіогенезу, тому зростання його рівня може свідчити і про посилення росту судин [170]. Таким чином, на цьому терміні репаративного остеогенезу інтенсивність імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів аналогічна показникам на 14 добу експерименту. Однозначно саме в цьому періоді репаративного остео-

генезу зростає активність процесів ангіогенезу, а також відбувається індукція остеобластів, що до певної міри може пояснити ті кардинальні зміни метаболізму кісткової тканини в цьому терміні остеорепарації. За цих умов зменшується інтенсивність процесів остеодеструкції (активність кислої фосфатази на 12,7% менша порівняно з показниками на 14 добу; $p < 0,05$), вірогідно знижується активність катаболічних процесів (рівень вільного оксипроліну в сироватці крові на 34,0% менший, ніж станом на 14 добу; $p < 0,05$). Одночасно зростає інтенсивність остеогенезу (активність лужної фосфатази в сироватці крові вірогідно збільшується на 17,8% відносно контролю), активує біосинтез колагену (рівень пептидозв'язаного оксипроліну достовірно перевищує на 19,9% контрольний показник). Указані зміни метаболізму кісткової тканини супроводжуються посиленням мінералізації, доказом чого є, по-перше, вірогідне зменшення вмісту кальцію в сироватці крові на 35,7% відносно контролю [101]; по-друге зростання індексу мінералізації на 32,9% відносно показника на 14 добу ($p < 0,05$).

Станом на 30 добу прояви імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів є мінімальними. Натомість активність остеобластів та інтенсивність перебігу ангіогенезу є максимальною (рівень ТФР- $\beta 1$ та VEGF у сироватці крові вірогідно перевищує на 25-65% показники контрольної групи; $p < 0,05$). Метаболічний патерн, який виникає на цьому етапі репаративного остеогенезу, до певної міри визначає особливості перебігу метаболічних процесів у кістковій тканині. За цих умов виразність остеодеструктивних та катаболічних процесів у кістковій тканині є мінімальною (вміст вільного оксипроліну та активність кислої фосфатази в сироватці крові на 19-35% перевищує контрольні показники; $p < 0,05$). Водночас активність остеогенезу та біосинтетичних процесів є максимальною (вміст пептидозв'язаного оксипроліну та активність лужної фосфатази в сироватці крові на 27-45% перевищує показники контрольної групи; $p < 0,05$). При цьому індекс мінералізації статистично вірогідно не відрізняється від контролю.

Станом на 45 добу більшість біохімічних та імунологічних показників повертається до норми.

На наступному етапі досліджень проведено кореляційний аналіз для встановлення біохімічних чинників, які найбільше інтегровані в механізми репаративного остеогенезу за модельованої патології. Установлено, що показники метаболізму колагену (вміст вільного та пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові) найсильніше корелюють із рівнем ТФР- β 1 : зростання рівня цього цитокіну супроводжується зменшенням процесів деградації колагену ($r=-0,45$; $p<0,05$) та зростанням колагеноутворення ($r=0,52$; $p<0,05$). Менші за силою кореляції виникали з рівнем прозапального цитокіну ФНП- α . Доведено, що активація імунозапальних реакцій зумовлює деградацію колагену ($r=0,38$; $p<0,05$) та має депримуєчий вплив на біосинтетичні процеси ($r=-0,40$; $p<0,05$). Найменш міцними є взаємозв'язки із вмістом в сироватці крові карбонільних груп протеїнів і метаболітів нітроген монооксиду. Посилення окисної модифікації протеїнів та нітрозативного стресу пов'язано з активацією процесів катаболізму ($r=0,35$; $0,39$; $p<0,05$) та зменшенням синтезу колагену ($r=-0,35$; $-0,38$; $p<0,05$).

Показники ремоделювання кісткової тканини найбільше пов'язані з рівнем факторів росту ТФР- β 1 та VEGF. Зростання вмісту цих факторів росту в крові асоціюється з індукцією остеогенезу ($r=0,52$; $0,54$; $p<0,05$) та зменшенням активності деструктивних процесів у кістковій тканині ($r=-0,59$; $-0,62$; $p<0,05$). Менші за силою зв'язки виникали між активністю фосфатаз та рівнем прозапальних цитокінів IL-8 та ФНП- α в сироватці крові. За цих умов посилення імунозапальних реакцій супроводжується активацією остеолітичних процесів ($r=0,40$; $0,48$; $p<0,05$) та інгібуванням остеогенезу ($r=-0,42$; $-0,45$; $p<0,05$). Найменші за модулем кореляції виникали між маркерами ремоделювання кістки та активністю продукції супероксидного аніону (НАДФН-оксидаза), окисної деградації протеїнів (КГП) і нітрозативного стресу (нітрити та нітрати). Активація оксидативного та нітрозативного

го стресів пов'язана з інтенсифікацією остеодеструкції ($r=-0,34$; $p<0,05$) та пригніченням остеогенезу ($r=0,35-0,37$; $p<0,05$)

Оскільки кореляційний аналіз характеризує лише силу та напрямок зв'язку між двома змінними величинами і не виявляє причинно-наслідковий зв'язок, ми провели множинний лінійний регресійний аналіз. Виявилось, що найбільш значущими та незалежними біохімічними показниками для прогнозування перебігу репаративного остеогенезу за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу є наступні: вміст у сироватці крові VEGF, ТФР- $\beta 1$, КГП, нітритів та нітратів. Порівняння коефіцієнтів регресії β підтверджує різницю впливу обраних предикторів у прогнозування перебігу репаративного остеогенезу. Встановлено, що за цих умов найбільш вагому роль в остеорепарації відіграє рівень ТФР- $\beta 1$ ($\beta=0,456$) у крові, дещо менше значення має вміст VEGF ($\beta=0,327$) і найменше – рівень КГП, нітритів та нітратів ($\beta=-0,210$; $-0,156$). Лабораторне дослідження вказаних біохімічних показників є необхідним для контролю перебігу репаративного остеогенезу за даної патології.

Наступний етап дослідження передбачав оцінку впливу імплантації деконсервованих фрагментів плаценти та введення кальцію цитрат на імунезапальні процеси, оксидативний та нітрозативний стреси, ендотоксемию та стан кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Досліди проведено на трьох групах тварин: 1 група (контроль) – щурі з модельованим відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (ПНШ + ОП); 2 група – щурі з модельованою патологією, яким проводили імплантацію деконсервованих фрагментів плаценти (ПНШ + ОП+КП); 3 група – щурі з модельованою патологією, яким, крім імплантації деконсервованих фрагментів плаценти, додатково вводили кальцію цитрат (ПНШ + ОП+КП+Ca). Дослідження проведено на 7, 14, 21, 30 та 45 добу після імплантації деконсервованих фрагментів плаценти.

Спочатку ми визначили вплив кріоконсервованої тканини плаценти на перебіг репаративного остеогенезу у тварин із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Виявилось, що **станом на 7 добу** кріоконсервована тканина плаценти досить помірно стримувала розвиток імунозапальних реакцій (вміст ТНФ- α в сироватці крові був меншим на 12,2% відносно контролю; $p < 0,05$), на рівні тенденції встановлено вплив на активність оксидативного та нітрозативного стресів. Одночасно зафіксовано досить незначний депримуєчий вплив біоплаценти на деградацію колагену (активність кислої фосфатази та рівень вільного оксипроліну на 15,6% менший, ніж у контролі; $p < 0,05$). За цих умов вміст кальцію в сироватці крові був достовірно меншим (на 15,7% відносно контролю; $p < 0,05$); активність остеолітичних процесів була меншою від контролю лише на рівні тенденції.

Станом на 14 добу встановлено помітний вплив кріоконсервованої тканини плаценти на імунозапальні реакції (вміст ТФР- $\beta 1$ та ІЛ-8 у сироватці крові був меншим відповідно на 17,4 та 11,7% відносно контролю; $p < 0,05$), ендотоксемию (рівень МСМ на 13,5% менший, ніж у контролі), оксидативний (вміст ТБК-РП та КГП відповідно на 83,9 та 100% менший, ніж у контролі; $p < 0,05$) та нітрозативний стреси (рівень нітритів та нітратів на 13,0% менший, ніж у контролі; $p < 0,05$). Однозначно кріоконсервована тканина плаценти стримує наростання остеодеструктивних процесів (активність кислої фосфатази на 12,5% менша, ніж у контролі; $p < 0,05$) та активації катаболізму колагену (рівень вільного оксипроліну на 41,8% менший, ніж у контролі; $p < 0,05$). За цих умов індекс мінералізації на 31,6% перевищував контрольні показники ($p < 0,05$).

Станом на 21 добу кріоконсервована тканина плаценти виявляє максимальний протизапальний, антитоксичний, антинітрозативний та антиоксидантний ефект. Поряд з цим розвивається активуючий вплив на остеобласти (рівень ТФР- $\beta 1$ на 46,5% перевищував контрольний показник; $p < 0,05$) та процеси ангіогенезу (рівень VEGF на 12,8% перевищував контрольний

показник; $p < 0,05$). Вплив на процеси остеодеструкції та катаболізм колагену був меншим, ніж на 14 добу (активність кислої фосфатази та вміст вільного оксипроліну відповідно на 10,2 та 23,6% менші, ніж у контролі; $p < 0,05$). Водночас встановлено стимулюючу дію кріоконсервованої тканини плаценти на процеси остеогенезу та колагеноутворення (активність лужної фосфатази та вміст пептидозв'язаного оксипроліну відповідно на 11,0 та 21,4% перевищували контрольні показники; $p < 0,05$). За цих умов індекс мінералізації та вміст кальцію був відповідно на 24,4 та 30,3% вищим, ніж на 14 добу ($p < 0,05$).

Станом на 30 добу показники імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів вірогідно не відрізнялись від показників у псевдооперованих тварин. Активуюча дія кріоконсервованої тканини плаценти на остеобласти (рівень ТФР- $\beta 1$ на 46,5% перевищував контрольний показник; $p < 0,05$) та процеси ангіогенезу (рівень VEGF на 12,8% перевищував контрольний показник; $p < 0,05$) є максимальною. Інтенсивність процесів катаболізму колагену достовірно не відрізняється від показників псевдооперованих тварин. Натомість процеси остеогенезу та колагеноутворення проходять досить інтенсивно (активність лужної фосфатази та вміст пептидозв'язаного оксипроліну відповідно на 13,9 та 13,0% перевищували контрольні показники; $p < 0,05$). Індекс мінералізації та вміст кальцію в сироватці крові перебувають на рівні показників псевдооперованих тварин.

Станом на 45 добу всі біохімічні та імунологічні показники повертаються до норми.

Таким чином, проведені дослідження переконують, що застосування кріоконсервованої тканини плаценти за умов відкритого ангулярного перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу запобігає імунозапальним реакціям, гіперактивації вільнорадикального окиснення ліпідів, окисній деструкції протеїнів, розвитку ендотоксемії та нітрозативного стресу, а також відновлює баланс у системі про-антиоксидатних ензимів. Указані ефекти кріокон-

сервованої тканини плаценти спостерігаються лише на 14 добу і досягають максимуму на 21 добу експерименту. Водночас монотерапія стимулює процеси ангіогенезу та активує клітини остеобластичного диферону з максимальною активністю на 21-30 добу експерименту. За цих умов посилюються колагеноутворення (максимум на 21 добу), мінералізація кісткової тканини (максимум на 14 добу) та зменшується активність остеодеструктивних процесів і катаболізму колагену (максимум на 14 добу).

Установлено вплив комбінованого застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат на перебіг репаративного остеогенезу у тварин із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Поєднане застосування цих препаратів має певні особливості порівняно з монотерапією. По-перше, протизапальна, антиоксидантна, антитоксична та антинітрозативна дії спостерігаються вже на 7 добу, а проангіогенна дія та стимулюючий ефект на остеобласти – на 14 добу експерименту. По-друге, вплив комбінованої терапії на досліджувані біохімічні та імунологічні процеси є сильнішим, ніж за умов монотерапії. По-третє, більшість досліджуваних показників за умов сумісного введення кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат повертаються до норми вже на 30 добу експерименту. Таким чином, використання кальцію цитрат зумовлює остеопротекторний ефект кріоконсервованої тканини плаценти.

За результатами власних досліджень складено схему (рис. 6.1) на якій показано ймовірні молекулярні механізми, що опосередковують остеопротекторну дію кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат у щурів із відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Зростання показників імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресів, а також специфічні зміни маркерів метаболізму кісткової тканини у відновлювальний період у контрольній групі вимагає активних лікувально-профілактичних заходів не лише в найближчі, а й віддалені періоди перелому нижньої щелепи.

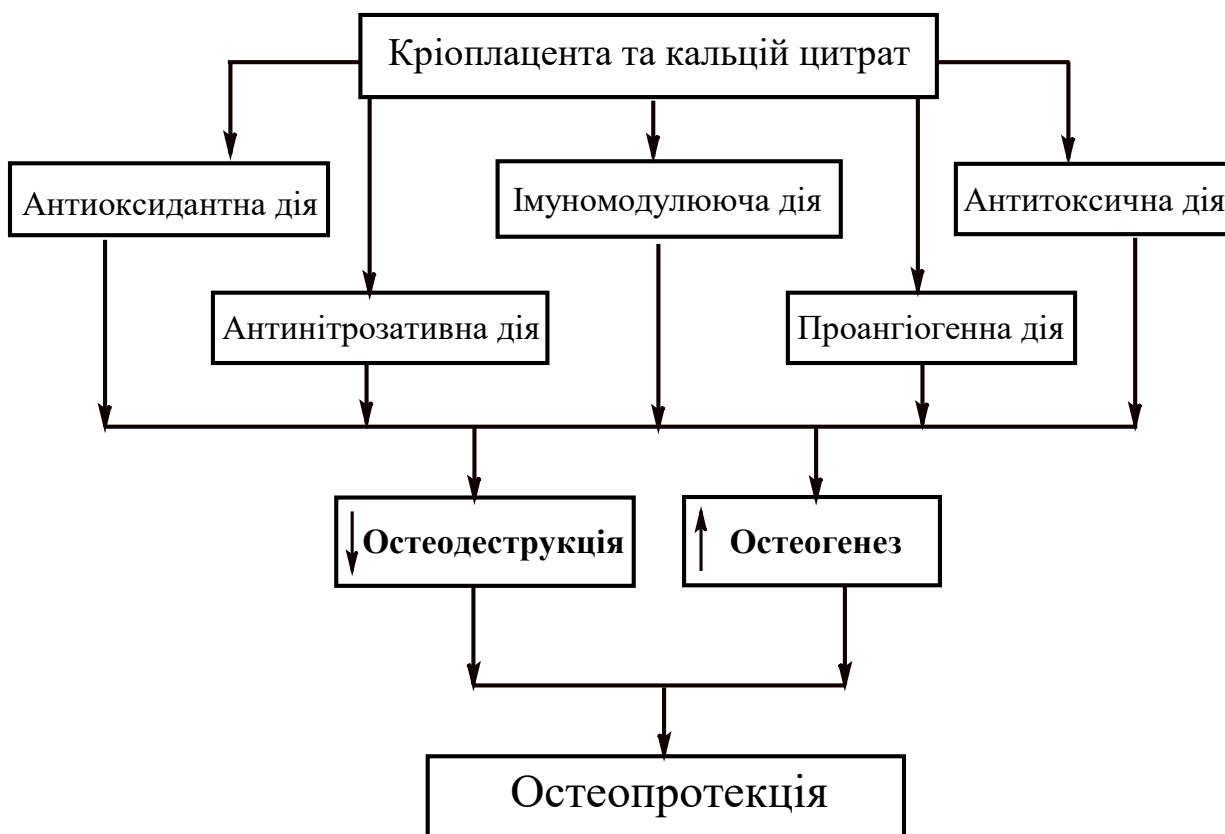


Рис. 6.1. Ймовірні молекулярні механізми впливу остеопротекторної дії комбінованого застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат.

Результати, отримані в експериментальній частині роботи, а також дані діагностичних досліджень, визначають показання до комбінованого застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат у комплексному лікуванні пацієнтів із порушеннями репаративного остеогенезу. Застосування кріоконсервованої тканини плаценти та кальцію цитрат ефективно для заміщення крайових кісткових дефектів, профілактики гнійно-запальних та імунологічних ускладнень.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і вирішення наукових завдань, що стосуються пошуку нових методологічних і методичних підходів корекції процесів репаративного остеогенезу кісткової тканини щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу, в умовах розвитку деструктивних, імунозапальних реакцій, ендотоксемії, оксидативного та нітрозативного стресу. Отримані експериментальні дані щодо особливостей протікання процесів, які відбуваються в ушкодженій кістковій тканині, ефективності застосування при даній патології кріоконсервованої тканини плаценти – окремо, а також у сполученні з кальція цитратом – дозволяють зробити наступні висновки:

1. Визначені особливості структурних змін кісткової тканини нижньої щелепи щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в динаміці репаративного остеогенезу, а саме: явища первинної тканинної реакції на 7 добу (деструкція, запалення, прогресування остеопорозу), що переростають на 14 добу в виражений запальний і деструктивний процес, який в подальшому (45 доба) визначається відмежуванням полів деструкції і секвестрів, зменшенням щільності секвестрів за рахунок вираженого остеосклерозу і відсутністю консолидації відламків кісток.

2. У щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу вже на 14 добу після травми відмічалася найвища активність імунозапальних реакцій (рівень ФНП- α в сироватці крові збільшився на 76,5 %, відносно псевдооперованих тварин; $p < 0,05$), ендотоксемії (вміст МСМ збільшувався на 39,1 %; $p < 0,05$), оксидативного та нітрозативного стресу (вміст карбонільних груп протеїнів, нітритів та нітратів збільшився відповідно у двічі та на 44,7 %; $p < 0,05$), остеодеструктивних процесів та катаболізму колагену (вміст вільного оксипроліну та активність кислої фосфатази збільшився відповідно на 114 та 65,8 %; $p < 0,05$). Станом на 30 добу від-

мічалась максимальна інтенсивність ангіогенезу (вміст VEGF збільшився на 24,7 %; $p < 0,05$), колагеноутворення та остеогенезу (вміст пептидозв'язаного оксипроліну та ТФР- $\beta 1$ збільшився відповідно на 44,6 та 65,3 %; $p < 0,05$). Більшість біохімічних параметрів та показників цитокінового профілю нормалізовувалося на 45 добу.

3. Визначено, що вміст VEGF, ТФР- $\beta 1$, карбонільних груп протеїнів, нітритів та нітратів в сироватці крові є важливими предикторними (прогностичними) маркерами прогнозування перебігу репаративного остеогенезу при відкритому ангулярному переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Найбільшу значущість для контролю процесів остеорепарації має визначення вмісту ТФР- $\beta 1$ та VEGF в сироватці крові ($\beta = 0,456$; $0,327$), дещо менше значення належить дослідженню рівня карбонільних груп протеїнів, а також нітритів та нітратів в сироватці крові ($\beta = -0,210$; $-0,156$).

4. Застосування кріоконсервованої тканини плаценти вже на 14 сприяло зменшенню активності остеодеструктивних процесів і катаболізму колагену, стримувало імунозапальні реакції, гіперактивацію вільнорадикального окиснення ліпідів, окисної деструкції протеїнів, розвиток ендотоксемії та нітрозативного стресу, відновлювало баланс в системі про-антиоксидантних ензимів, що досягало максимуму на 21 добу. Суттєво, що вже з 21 доби спостерігається активація клітин остеобластичного диферону, що сприяло посиленню процесів колагеноутворення і ангіогенезу і формуванню на 30 добу новоутвореної кісткової тканини, за рахунок чого відбувалося зрощення фрагментів кістки.

5. Сумісне застосування кріоконсервованої тканини плаценти з кальція цитратом сприяло початку нормалізації параметрів біохімічних процесів вже на 7 добу експерименту; на 21 добу визначали максимальний протизапальний (рівень ФНП- α в сироватці крові був нижчим на 44,5 %, порівняно з групою без лікування; $p < 0,05$), нормалізувалися антиоксидантні (вміст карбонільних груп протеїнів, нітритів та нітратів зменшувався на 49,9 та 31,0 %; $p < 0,05$), антитоксичні (вміст молекул середньої маси був меншим

на 27,6 %; $p < 0,05$) та проангіогенні (вміст VEGF був більшим на 28,2 %; $p < 0,05$) процеси. Відмічалась найбільша активність остеогенезу та біосинтезу колагену (вміст пептидозв'язаного оксипроліну та ТФР- β 1 збільшився відповідно на 35,2 та 36,2 %; $p < 0,05$).

6. Поєднане застосування кріоконсервованої тканини плаценти і кальція цитрат у щурів з відкритим ангулярним переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу мало виражений позитивний вплив на морфологічну структуру кісткової тканини нижньої щелепи, ніж тільки самостійне використання кріоконсервованої тканини плаценти. Знижувались ознаки прояву дистрофічних, деструктивних і запальних процесів в тканині за рахунок збільшення полів новоутвореної кісткової тканини, їх компактного зрощення і формування новоутвореного кортикального шару кісткової тканини. Значно прискорювався термін консолідації уламків і зрощення фрагментів кістки: на 30 добу лінія перелому вже не простежувалася, а на 45 відбувалася повна консолідація відламків і утворення щільної кісткової мозолі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Астрелина ТА, Гомзяков АЕ, Кобзева ИВ, Карпова ЕЭ, Круглова ЯА, Скоробогатова ЕВ, Балашов ДН, Князев ОВ, Яковлева МВ. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике. Гены и клетки. 2013;8(4):82-7.
2. Афанасьев ВВ. Травматология челюстно-лицевой области. М.: Медицина. 2010:256.
3. Баддинов ОВ, Лукьянчук ВД, Савченкова ЛВ. Современные представления о патогенезе эндотоксикоза посттравматического генеза. Соуч. проблемы токсикологии. 2003;(4):25-30.
4. Бадертдинов РР. Регенерация человека – реальность наших дней. Успехи современного естествознания. 2012;(7):8-18.
5. Барсукова КВ, Горшкова ОМ. Гистохимическая оценка процесса регенерации костной ткани при использовании препарата «Тизоль». Журнал анатомии и гистопатологии. 2013;2(3):58-60.
6. Батура ІО. Вплив екзогенного гідрокортизону на ріст, будову та репаративну регенерацію стегнових кісток щурів різного віку. (Candidate dissertation, 2008. Київський національний університет імені Т. Шевченка).
7. Березка НИ, Литовченко ВА, Иванов АН, Горячий ЕВ. Оптимизация репаративного остеогенеза при дисрегенерации костной ткани. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2011;20(141):46-50.
8. Білаш СМ. Особливості лектиноспецифічності структурних компонентів кардіальної частини шлунку після введення криоконсервованої плаценти на тлі гострого експериментального запалення. Світ медицини та біології. 2014;10,2(44):97-100.

9. Боброва ЕН, Щетинский МИ, Зинченко АВ, Розанова ЕД. Состояние воды в экстрактах и суспензиях клеток с экстрактами криоконсервированной плаценты. В материалах международной заочной научно-практической конференции 2014 (стр. 109-112). Сыктывкар.
10. Брагина ВГ, Горбатова ЛН. Травма челюстно-лицевой области у детей. Экология человека. 2014;(2):20-4.
11. Варес Я. Е., Філіпський А. В., Філіпська Т. А. Травматогенез і структура переломів нижньої щелепи // Практична медицина. 2011, № 17(5). С. 9-14.
12. Васильев АЮ, Буланова ИМ, Мальгинов НН, Киселева ЕВ, Черняев СЕ, Никулина ОМ, Воложин АИ. Возможности цифровой микрофокусной рентгенографии при оценке репаративной регенерации костной ткани в эксперименте. Вестник рентгенологии и радиологии. 2008;(3):21-5.
13. Васильев РГ, Оксимец ВМ, Зубов ДА, Новикова СН. Использование клеточной терапии и тканевой инженерии для восстановления дефектов костной ткани: биотехнологические аспекты и клинические результаты. Проблемы остеологии. 2015;18(2):12-22.
14. Вільхова ОВ, Шепітько ВІ. Морфофункціональна характеристика гемікроциркуляторного русла малих слинних залоз твердого піднебіння при підшкірній трансплантації кріоконсервованої плаценти. Український морфологічний альманах. 2008;6(1):216-7.
15. Владимиров ЮВ, Арчаков АИ. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.:Медицина. 1972:252.
16. Волков АВ, Большакова ГБ. Гистоморфометрия костной ткани в регенеративной медицине. Клиническая и экспериментальная морфология. 2013;(3):65-72.
17. Волкова ОВ, Елецкий ЮК. Основы гистологии и гистологической техники. М.:Медицина. 1982:304.
18. Волотовский АИ, Макаревич ЕР, Чирак ВЭ. Регенерация костной ткани в норме и при патологии. Минск. 2010:24.

19. Габриэлян НИ, Дмитриев АА, Кулаков ГН, Мекикян АМ, Щербанева ОИ. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях. Клиническая медицина. 1981;(10):38-42.
20. Гольцев АН, Юрченко ТН. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Харьков. 2013:317.
21. Грищенко НГ, Геродес АГ, Перлыгин ИВ. Влияние терапии препаратами экстракта плаценты на динамику показателей клеточного звена иммунитета в периферической крови и фолликулярной жидкости пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием. Международный медицинский журнал. 2011;(1):84-8.
22. Грищенко ВІ, Прокопюк ОС, Кузьміна ІЮ, Юрченко ТМ, Строна ВІ, Юхимук ЛМ. Заготівля, кріоконсервування плацентарної тканини та її клінічне застосування. Харків. 1996:15.
23. Грищенко ВИ, Юрченко ТН. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харків. 2011:292.
24. Грищенко МГ. Патогенетичні основи вдосконалення допоміжних репродуктивних технологій у жінок, які перенесли хронічні запальні захворювання органів малого таза. (Doctoral dissertation, 2011. Харківський національний медичний університет).
25. Громова ОА, Торшин ИЮ, Диброва ЕА, Каримова ИМ, Гилельс АВ, Кустова ЕВ. Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека: результаты клинических и экспериментальных исследований. Обзор. Пластическая хирургия и косметология. 2011;(3):385-576.
26. Гулида МО, Мирошниченко ЕВ, Берёзка НИ, Горячий ЕВ. Применение экстракта плаценты в комплексном лечении больных ревматоидным артритом. Экспериментальна і клінічна медицина. 2014;1(62):168-71.
27. Гулюк АГ, Желнин ЕВ. Взаимосвязь маркеров остеогенеза и процессов посттравматической регенерации альвеолярной кости у крыс. Фундаментальные исследования. 2013;(7):534-9.

28. Гулюк АГ, Тащян АЭ, Гулюк ЛН. Профилактика осложнений консолидации при переломах нижней челюсти у больных со структурно-метаболическими изменениями костной ткани. Вісник стоматології. 2012;(2):65-71.
29. Дедух НВ, Панков ЕЯ. Скелетные ткани. Руководство по гистологии. 2001;(1):284-327.
30. Деев РВ, Бозо ИЯ, Дробышев АЮ, Исаев АА. Эффективность ген-активированного остеопластического материала с плазмидными ДНК, содержащими ген VEGF, в замещении костных дефектов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013;23(3):355-8.
31. Демин ЮА, Демина МЮ, Сергиенко АН. Изучение потенциальной роли криоконсервированных мезехимальных стромальных клеток плаценты в ингибировании нейродегенеративных изменений сетчатки при стрептозотциновом диабете 2 типа по динамике изменений VEGF и BDNF. Международный научно-исследовательский журнал. 2016;1(43),3:49-51.
32. Дедух НВ, Батура Ю. Структурно-метаболическі особливості кісткової тканини та репаративного остеогенезу в умовах експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу (огляд літератури). Ортопедия, травматология и протезирование. 2010;(3):133-8.
33. Дубровин ДМ, Копецкий МН, Полунин ВС. Медико-социальная характеристика больных с повреждениями челюстно-лицевой области. Вестник Росздравнадзора. 2013;(2):46-8.
34. Єрошенко ГА, Шепітько ІВ, Лисаченко ОД, Гнідець ВА. Вплив трансплантації кріоконсервованої плаценти на структуру привушної залози. Труды Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского. 2010;146(5):194.
35. Желнин ЕВ. Маркеры остеогенеза и их связь с процессами ремоделирования альвеолярной кости в эксперименте. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2012;12(4):126-30.

36. Желнин ЕВ. Морфологические особенности посттравматической регенерации альвеолярной кости в эксперименте. Український морфологічний альманах. 2012;10(3):35-8.
37. Желнин ЕВ. Биохимические критерии прогнозирования посттравматической регенерации альвеолярной кости в эксперименте. Фундаментальные исследования. 2013;(9-6):1006-10.
38. Заїчко НВ. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артрити та її зміни під впливом фармакотерапії амізоном, індометацином, німесулідом. Вісник Вінницького державного медичного університету. 2003;7(2/2):664-6.
39. Зекий АО, Зекий ОЕ. Остеопороз и состояние костного ремоделирования нижней челюсти. Справочник врача общей практики. 2014;(5):54-8.
40. Золотухин СЕ, Берест ЕЛ, Коробов ВП, Чирах ТМ. Прогнозирование гнойно-воспалительных осложнений при переломах нижней челюсти (I часть). Травма. 2012;13(4):128-31.
41. Золотухин СЕ, Берест ЕЛ, Коробов ВП, Чирах ТМ. Прогнозирование гнойно-воспалительных осложнений при переломах нижней челюсти (II часть). Травма. 2012;13(4):144-51.
42. Золотухин СЕ, Шпаченко НН, Махнева АВ, Степанюк ДА. Особенности развития бактериемии и сепсиса при гнойно-воспалительных осложнениях травматической болезни. Травма. 2011;12(3):44-7.
43. Зубов ДА, Оксимец ВМ. Цитокиновая иммунорегуляция репаративной регенерации костной ткани культивированными мезенхимальными стволовыми клетками. Травма. 2008;9(2):145-53.
44. Иванов ВП. Клиническая ветеринарная рентгенология. Москва. 2014:624.
45. Калініченко МВ, Єрошенко ГА, Шепітько ВІ, Коваль ВМ. Вплив трансплантації кріоконсервованої плаценти при гострому асептичному стоматиті на клітинний склад піднижньощелепних лімфатичних вузлів. Світ медицини та біології. 2008;(3):106-11.

46. Капустянська АА. Застосування препарату «Кріоцелл-кріо-екстракт плаценти» в комплексному лікуванні загострення подагричного артриту з метаболічним артритом. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник УМСА. 2010;10,2(30):54-8.
47. Кацай ВВ. Морфофункціональний стан селезінки в нормі, експериментальному асептичному запаленні та при трансплантації кріоконсервованої плаценти. (Candidate dissertation, 2013. Івано-Франківський національний медичний університет).
48. Кебкало АБ, Лобинцева ГС, Семіног ВІ, Шаблій ВА. Використання пуповинної крові та пуповинного канатика в комплексному лікуванні хворих на некротичний панкреатит. Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва. 2012;(1):77-85.
49. Ковалев ГА, Высеканцев ИП, Ищенко ИО, Абрафикова ЛГ, Олефиренко АА, Сандомирский БП. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови и экстракта плаценты на заживление холодовых ран. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015;25(1):57-66.
50. Кожем'якін ЮМ, Хромов ОС, Болдирєва НЄ, Добреля НВ, Сайфетдінова ГЛ. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. Київ. 2017:182.
51. Кондаков ИИ. Сравнительная морфологическая оценка ангиотрофических эффектов криоконсервированной плаценты при экспериментальном атеросклерозе. В збірнику «Щорічні терапевтичні читання: роль медичної науки в рішенні проблем внутрішніх хвороб» 2007 (стор. 76). Харків.
52. Кондаков ИИ, Юрченко ТН, Марченко ЛН, Говоруха ТП, Шарлай ТМ, Жуликова ЕП, Страна ВИ. Обоснование применения препаратов криоконсервированной плаценты для коррекции почечной недостаточности. Проблемы криобиологии. 2012;22(3):259.
53. Копчак АВ. Безпосередні та віддаленні результати хірургічного лікування хворих з приводу травматичного перелому нижньої щелепи. Клінічна хірургія. 2014;(1):56-60.

54. Коренман ИИ. Методы определения органических соединений. М.: Медицина. 1975:358.
55. Корж НА, Дедух НВ, Никольченко ОА. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома (сообщение 3). Ортопедия, травматология и протезирование. 2006;(2):93-9.
56. Коротких НГ, Лесникова ИН, Барсукова КВ. Морфологические критерии регенерации кости нижней челюсти у кроликов при использовании в терапии препарата «Тизоль». Вестник новых медицинских технологий. 2013;(1):60.
57. Котельников ГП, Колсанов АВ, Щербовских АЕ, Николаенко АН, Приходько СА, Попов НВ, Хассан МА. Реконструкция посттравматических и постоперационных дефектов нижней челюсти. Хирургия. 2017;(7):69-72.
58. Кочетов ГА. Практическое руководство по энзимологии. М.: Медицина. 1980:272.
59. Кузнецова ИВ, Шевелева ТВ, Побединская ОС, Успенская ЮБ, Гилельс АВ. Применение гидролизата плаценты человека в терапии недостаточной пролиферации плаценты эндометрия. Акушерство и гинекология. 2013;(3):44.
60. Левицкий АП, Макаренко ОА, Деньга ОВ. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза. Київ. 2005:50.
61. Левицький АП, Макаренко ОА, Ходаков ІВ, Зеленина ЮВ. Ферментативний метод оцінки стану кісткової тканини. Одеський медичний журнал. 2006;(3):17-21.
62. Лихицкий АА. Репаративная регенерация костной ткани под влиянием криоконсервированной плаценты. В журнале «Проблемы криобиологии и криомедицины» 2014 Май; 2(Том 24, стр. 170). Харьков.
63. Лихицкий АА. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти. Клінічна стоматологія. 2016 Лют;1(14):37-41.

64. Ліхницький ОО. Особливості репаративного остеогенезу в експерименті при відкритому переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації криоконсервованої тканини плаценти людини. В збірнику тез «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» 2018 січ. (стор. 111-114). Львів, ГО «Львівська медична спільнота».
65. Луценко ЕД. Популяционный состав и функциональный потенциал клеток плаценты, криоконсервированной в различных режимах. Мир медицины и биологии. 2009;3(3-1):105-9.
66. Луценко ЕД, Останков МВ, Гольцев АН. Сравнительный анализ фенотипических характеристик клеток плаценты до и после криоконсервирования. В материалах Международной конференции 2014 (стр. 175-178). Сыктывкар.
67. Луценко НС, Прокопюк ОС, Бондаренко ИА, Гераскина ЛР, Евтарева ИА. Применение криоконсервированной плацентарной ткани при изоиммунизации беременных женщин. Проблемы криобиологии. 2008;18(3):316-8.
68. Майбородин ИВ, Колесников ИС, Шевела АИ, Шеплев БВ, Дровосеков МН, Тодер МС. Влияние фибринового сгустка при повреждении кости нижней челюсти в эксперименте. Стоматология. 2011;(4):9-12.
69. Майбородин ИВ, Матвеева ВА, Колесников ИС, Дровосеков МН, Тодер МС, Шевела АИ. Влияние аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения на регенерацию поврежденной кости нижней челюсти крыс. Стоматология. 2012;(1):5-8.
70. Майбородин ИВ, Матвеева ВА, Шевела АИ, Шеплев БВ, Колесников ИС, Выборнов МС, Шевела АА. Применение биodeградируемых полигидроксикапролатов после повреждения кости нижней челюсти в эксперименте. Клиническая стоматология. 2010;(4):54-7.
71. Мамонов РО, Ілленко НА. Біохімічні зміни у сироватці крові хворих на переломи нижньої щелепи. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2013;2(2);264.

72. Матолич УД, Лаповець ЛЄ, Горицький ВМ. Цитокиновий профіль си-
роватки крові при ранніх та пізніх ускладненнях переломів нижньої щеле-
пи. Практична медицина. 2011;17(3):59-64.
73. Матолич УД, Уштан СВ, Лаповець ЛЄ. Прозапальні цитокіни при
ранніх ускладненнях переломів нижньої щелепи. Практична медицина.
2009;15(5):51-4.
74. Меньшиков ВВ. Лабораторные методы исследования в клинике:
Справочник. М.:Медицина. 1987:368.
75. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ. Создание
криозащитных сред для сохранения эксплантов ткани плаценты.
Biotechnologia acta. 2013;6(6):132-8.
76. Нагірний ЯП. Аналіз частоти і структури травматичних переломів
нижньої щелепи у Тернопільській області. Вісник наукових досліджень.
2010;(4):99-101.
77. Нардід О. До порушень внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій бі-
омакромолекул під дією низьких температур. Вісник Львівського універси-
тету. Серія біологія. 2014;(68):293-303.
78. Нарожный СВ, Нардид ОА, Розанова ЕД, Покрышко СВ. Влияние за-
мораживания плаценты на антиоксидантное действие ее экстрактов по от-
ношению к эритроцитам при окислительном стрессе. Вісник проблем
біології і медицини. 2017;4,3(141):168-172.
79. Насадюк ХМ. Біохімічна характеристика та підходи до застосування
екстрактів плаценти в медичній практиці. З турботою про жінку.
2013;4(43):54-6.
80. Оскольский ГИ, Юркевич АВ. Челюстно-лицевая ортопедия. Учебное
пособие. Хабаровск. 2013:168.
81. Платонов АЕ. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи,
терминология, логика, компьютерные методы. Москва. 2000:52.
82. Погранична ХР. Принципи лікування переломів нижньої щелепи. Ме-
дицина транспорту України. 2013;(3):86-90.

83. Понуровская ЕА. Клинико-патогенетическое обоснование применения селена в комплексном лечении больных с переломом нижней челюсти (Candidate dissertation, 2009. Читинская государственная медицинская академия).
84. Попович ЯО. Препарати кріоконсервованої кордової крові в комплексному хірургічному лікуванні гнійних ускладнень цукрового діабету II типу. Проблеми криобиології и криомедицины. 2014;24(4):332-45.
85. Прокопюк ВЮ, Трифонов ВЮ, Прокопюк ОС, Черемський АК, Зуб ЛІ. Клінічна ефективність прегравідарної підготовки жінок з антифосфоліпідним синдромом. Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2011;(2):78-81.
86. Прокопюк ОС. Коррекция сенильно-инволютивных процессов с использованием криоконсервированных фрагментов плаценты. В сборнике «Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве, медицине» 2013 (стр. 123-126). Брест.
87. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ. Использование криоконсервированных препаратов плаценты для коррекции возрастных изменений. В зб. присвяченому пам'яті В.В. Фролькіс «Актуальні питання геронтології та геріатрії» 2013 (стр. 48). Київ.
88. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Плацентарная терапия гериатрических изменений репродуктивной функции. В сборнике «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» 2014 (стр. 185-186). Уфа.
89. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, Чижевський ВВ, Трифонов ВЮ, Карпенко ВГ, Логінова ОО. Імплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти людини відновлює прооксидантно-антиоксидантний баланс у експериментальних тварин пізнього онтогенезу. Проблеми криобиології и криомедицины. 2017;27(1):61-70.
90. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Чижевський ВВ. Спосіб кріоконсервування тканини плаценти. Патент України. 2006; №A01N1/2; Бюл. 2006(7).

91. Прокопюк ОС, Чижевський ВВ, Мусатова ІБ. Про можливість корекції геріатричних змін за допомогою кріоконсервованих плацентарних біопрепаратів. Практична медицина. 2008;14(3):250.
92. Пудов АН, Спиридонова ЕА, Дробышев АЮ, Бобринская ИГ, Лагутин МБ. Психологический статус у пациентов с острой травмой нижней челюсти. Общая реаниматология. 2012;(1):31-5.
93. Рассохин АВ. Тканевая плацентарная терапия. Санкт-Петербург. 2014:205.
94. Рєпін МВ, Марченко ЛМ, Говоруха ТП, Васькович АМ, Строка ВІ, Кондаков ІІ, Брусенцов ОФ. Вплив попереднього введення кріоекстрактів плаценти різного походження на морфофункціональний стан нирок щурів при моделюванні гострої ниркової недостатності. Експериментальна і клінічна медицина. 2017;2(75):37-43.
95. Розанова СЛ, Науменко ЕИ, Розанова ЕД, Нардид ОА. Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания. Проблемы криобиологии. 2010;20(3):288-95.
96. Ролік ОВ, Засаднюк ІА. Незрощення довгих кісток (аналіз, фактори ризику, лікувальна тактика). Ортопедия, травматология и протезирование. 2005;(2):61-4.
97. Рузін ГП, Чирик ОІ. Сучасні принципи медикаментозного лікування переломів нижньої щелепи. Український стоматологічний альманах. 2013;(6):109-112.
98. Сахаров АВ. Сравнительное исследование репаративной регенерации костной ткани при использовании тканеинженерной матрицы на основе материала «ТИОПРОСТ» и материала «КОЛЛАПАН-М». Гены и клетки. 2011;6(4):89-94.
99. Селькина АБ, Шепитько ВИ, Ерошенко ГА. Структурная организация слизистой оболочки языка после трансплантации криоконсервированной плаценты. Актуальные вопросы клеточной и тканевой трансплантологии. 2010;(4):115.

100. Семизоров АН. Рентгенография в диагностике и лечении переломов костей. Пособие для врачей. М.: Медицина. 2007:176.
101. Сикора ВЗ, Погорелов МВ, Ткач ГФ, Бумейстер ВИ. Неколлагеновые белки костного матрикса как маркеры ремоделирования кости. Український морфологічний альманах. 2011;9,3(D):28-35.
102. Сікора ВЗ, Погорелов МВ, Бумейстер ВІ, Ткач ГФ. Біохімічні показники крові в різні терміни репаративного остеогенеза. Проблеми, досягнення і перспективи розвитку медико-біологічних наук і практичного здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского. 2007;143(IV):84-6.
103. Скотаренко ТА. Реакція гемомікроциркуляторного русла наднирника при корекції гострого асептичного перитоніту введенням кріоконсервованої плаценти у щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2016;2(129):310-1.
104. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів : Методичні рекомендації. Київ. 2001:528.
105. Строна ВІ, Юрченко ТМ. Вміст біологічно активних сполук в тканині і кріоекстракті плаценти. В матеріалах Международной заочной научно-практической конференции 2014 (стр. 233-237). Сыктывкар.
106. Топчій П, Кондаков П, Кірієнко ОМ. Вплив кріоекстракту плаценти людини на структурно- функціональний стан нирок щурів при моделюванні гострої та хронічної ниркової недостатності. Український журнал нефрології та діалізу. 2014;3(43):62-7.
107. Трифонов БВ. Регенерация костной ткани при заполнении ее дефекта композитом «титановое волокно – костнопластический материал». Композиты и наноструктуры. 2013;2(18):59-64.
108. Умаров ФХ. Регенерация кости и кровоснабжение. Український медичний альманах. 2010;13(1):199-202.
109. Фалько ОВ. Применение сыворотки плацентарной крови человека – перспективный метод коррекции атеросклеротических изменений (экспериментальное исследование). Проблеми криобиології. 2012;22(2):133-43.

110. Фаренюк ОО. Розробка методики індивідуального підбору варіанта лікування пацієнтів із переломами нижньої щелепи. Український стоматологічний альманах. 2014;(1):51-62.

111. Хадарцев АА, Субботина ТИ, Иванов ДВ, Гонтарев СН. Медико-биологические аспекты клеточных технологий: Монография. Тула. 2013:287.

112. Христофорандо ДЮ, Карпов СМ. Восстановительно-компенсаторные механизмы у больных с черепно-лицевой травмой. Вестник Медицинского стоматологического института. 2011;(11):51-53.

113. Черниченко АА. Репаративная регенерация костной ткани нижней челюсти при использовании титанового имплантата в эксперименте. Сибирское медицинское обозрение. 2008;49(1):29-33.

114. Черняев СЕ, Киселева ЕВ. Возможности использования стволовых клеток у детей с патологией челюстно-лицевой области. В материалах III Всероссийской научно-практической конференции «Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения» 2009 (стр. 190-192). Москва.

115. Чирик АИ. Состояние маркеров ремоделирования костной ткани у пациентов молодого возраста с переломами нижней челюсти. В трудах VII Международной научно-практической конференции «Стоматология славянских государств» 2014 (стр. 424-427). Белгород.

116. Шаблий ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко АН, Лукаш ЛЛ, Лобынцева ГС. Криоконсервирование ткани плаценты человека – источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012;(VII):54-62.

117. Шаблий В, Кучма М, Кирик В, Онищенко Г, Цупиков О, Клименко П, Кучук О, Габриелян А, Доманский Т, Онищенко В. Мезенхимальные стромальные клетки из нативной и криоконсервированной плаценты человека:

фенотип, мультипотентность и миграционный потенциал *in vivo*. Проблемы криобиологии. 2012;22(2):157-60.

118. Шаблій ВА, Кучма МД, Кирик ВМ, Онищенко ГМ, Цупіков ОМ, Клименко ПП, Арешков ПО, Кучук ОВ, Лукаш ЛЛ, Лобинцева ГС. Фенотип і міграційний потенціал мультипотентних мезенхімних стромальних клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти людини. *Biotechnologia Acta*. 2012;5(5):34-44.

119. Шараев ПН, Сахабутдинова ЕП, Лекомцева ОИ, Кошикова СВ. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009;(1):7-8.

120. Шарлай ТМ, Юрченко ТН. Влияние кріоконсервированных экстракта плаценты и плодовых тканей на эпителизацию раневой поверхности роговицы. В материалах Международной заочной научно-практической конференции 2014 (стр. 242-244). Сыктывкар.

121. Шевченко НО, Сомова КВ, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС. Динаміка активності та тривалості функціонування кріоконсервованих кріоекстракту, клітин та фрагментів плаценти в організмі експериментальних тварин. *Morphologia*. 2016;10(2):93-8.

122. Шепітько КВ, Шепітько ВИ, Юрченко ТН, Строна ВИ. Влияние кріоконсервированной плацентарной ткани на течение стабильной стенокардии. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2012;13(1):146-9.

123. Шепітько ІВ, Шепітько ВІ, Єрошенко ГА, Лисаченко ОД. Стан гемомікроциркуляторного русла піднижньощелепної слинної залози щурів при введенні кріоконсервованої плаценти та експериментальному сіаладеніті. *Світ медицини та біології*. 2012;8(1):162-7.

124. Шепітько КВ. Морфометрична характеристика стінки клубової кишки при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного запалення черевної порожнини у щурів. *Світ медицини та біології*. 2014;3(45):158-61.

125. Шепітько КВ. Дослідження ступеня зв'язування лектинів у слизовій оболонці порожньої кишки в нормі і після введення кріоконсервованої плаценти на тлі гострого запалення очеревини. Експериментальна і клінічна медицина. 2015;2:50-6.

126. Шепітько КВ. Дослідження ступеня зв'язування лектинів у слизовій оболонці дванадцятипалої кишки при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного запалення очеревини у щурів. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2015;14(1):57-61.

127. Шепітько КВ. Характеристика гемомікроциркуляторного русла слизової оболонки дванадцятипалої кишки при трансплантації кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного запалення очеревини у щурів. Світ медицини та біології. 2015;2(49):151-5.

128. Шепітько КВ. Характеристика ендокриноцитів тонкої кишки при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного запалення очеревини в щурів. Морфологія. 2015;15(2):91-4.

129. Штейнле АВ. Посттравматическая регенерация костной ткани (часть 1). Сибирский медицинский журнал (Томск). 2009;24(4-1):101-108.

130. Штейнле АВ. Посттравматическая регенерация костной ткани (часть 1). Сибирский медицинский журнал (Томск). 2009;24(4-1):114-118.

131. Юрченко ТМ, Говоруха ТП, Марченко ЛМ, Кондаков П, Рєпін МВ. Ультраструктура і функціональні особливості нирок щурів при моделюванні токсичної гострої ниркової недостатності. Експериментальна і клінічна медицина. 2012;(3):49-53.

132. Юрченко ТМ, Юрченко ТН, Капустянська АА, Капустянская АА, Шепітько ВІ, Шепітько ВІ. Лечение подагрического артрита у больных с ожирением с использованием криоконсервированного экстракта плаценты. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013;23(4):326-37.

133. Юрченко ТН, Кондаков ИИ, Строна ВІ. Ренальные эффекты при введении криоэкстракта плаценты на фоне экспериментальной почечной недостаточности. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014;24(1):75-8.

134. Якушко ОС. Корегуюча дія трансплантації кріоконсервованої плаценти на перебіг гострого асептичного невриту зорового нерва щурів у віддалені терміни спостереження. Мир медицины и биологии. 2010;6(3):104-8.
135. Ярыгин КН, Семченко ВВ, Ерениев СИ, Ярыгин ВН, Степанов СС, Дыгай АМ, Петровский ФИ, Лебедев ИН. Регенеративная биология и медицина. Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы. Москва, Омск, Томск, Ханты-Мансийск: Омская областная типография. 2015:178-82.
136. Arosarena O, Ducic Y, Tollefson TT. Mandible fractures: discussion and debate. Facial Plastic Surgery Clinics. 2012 Aug 1;20(3):347-63.
137. Avenell A, Mak JC, O'Connell D. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2014;(4):CD000227.
138. Bauer DC. Calcium supplements and fracture prevention. New England Journal of Medicine. 2013 Oct 17;369(16):1537-43.
139. Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, Ilic N, Murray P, Hancock S, Antonenas V, Huang G, Gottlieb D, Bradstock K, Atkinson K. Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. British journal of haematology. 2009 Feb;144(4):571-9.
140. Caplan AI, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. Journal of Orthopaedic Research. 2011 Dec;29(12):1795-803.
141. Castro-Lionard K, Dargent-Molina P, Fermanian C, Gonthier R, Cassou B. Use of calcium supplements, vitamin D supplements and specific osteoporosis drugs among french women aged 75–85 years: patterns of use and associated factors. Drugs & aging. 2013 Dec 1;30(12):1029-38.
142. Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McGuire MH. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. Bone. 1999 Sep 1;25(3):321-32.

143. Charles JF, Nakamura MC. Bone and the innate immune system. *Current osteoporosis reports*. 2014 Mar 1;12(1):1-8.
144. Cipriano CA, Issack PS, Shindle L, Werner CM, Helfet DL, Lane JM. Recent advances toward the clinical application of PTH (1-34) in fracture healing. *HSS journal*. 2009 Sep 1;5(2):149.
145. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012 Mar;8(3):133.
146. Colleoni F, Morash AJ, Ashmore T, Monk M, Burton GJ, Murray AJ. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis. *Placenta*. 2012 Feb 1;33(2):122-3.
147. Cooke M, Tan EK, Mandrycky C, He H, O'Connell J, Tseng SC. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue. *Journal of wound care*. 2014 Oct 2;23(10):465-76.
148. Cooper C, Reginster JY, Cortet B, Diaz-Curiel M, Lorenc RS, Kanis JA, Rizzoli R. Long-term treatment of osteoporosis in postmenopausal women: a review from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF). *Current medical research and opinion*. 2012 Mar 1;28(3):475-91.
149. Dillon JK, Christensen B, McDonald T, Huang S, Gauger P, Gomez P. The financial burden of mandibular trauma. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2012 Sep 1;70(9):2124-34.
150. Dodd DZ, Rowe DJ. The relationship between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *American Dental Hygienists' Association*. 2013 Dec 1;87(6):336-44.
151. Fan ZX, Lu Y, Deng L, Li XQ, Zhi W, Li-Ling J, Yang ZM, Xie HQ. Placenta-versus bone-marrow-derived mesenchymal cells for the repair of segmental bone defects in a rabbit model. *The FEBS journal*. 2012 Jul;279(13):2455-65.

152. Feng J, Liu S, Ma S, Zhao J, Zhang W, Qi W, Cao P, Wang Z, Lei W. Protective effects of resveratrol on postmenopausal osteoporosis: regulation of SIRT1-NF- κ B signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2014 Dec 1;46(12):1024-33.
153. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers IV Q, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griending KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circulation research.* 1997 Jan 1;80(1):45-51.
154. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, Ignatius A, Wildemann B, Lienau J, Peters A, Willie B. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater.* 2013 Jul 16;26(1):12.
155. Garrod A, Batra G, Ptacek I, Heazell AE. Duration and method of tissue storage alters placental morphology—implications for clinical and research practice. *Placenta.* 2013 Nov 1;34(11):1116-9.
156. Goldhahn J, Little D, Mitchell P, Fazzalari NL, Reid IR, Aspenberg P, Marsh D. Evidence for anti-osteoporosis therapy in acute fracture situations—recommendations of a multidisciplinary workshop of the International Society for Fracture Repair. *Bone.* 2010;46(2):267-71.
157. Goldhahn J, Scheele WH, Mitlak BH, Abadie E, Aspenberg P, Augat P, Brandi ML, Burlet N, Chines A, Delmas PD, Dupin-Roger I. Clinical evaluation of medicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. *Bone.* 2008 Aug 1;43(2):343-7.
158. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Rengenological features of morphogenesis of regenerate in rats with open fracture of lower jaw with osteoporosis which recepted the calcium citrate with improvement of cryoplacenta. *Reports of Morphology.* 2017 Oct; 2(23):248-52.
159. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. The role of immune-inflammatory processes and oxidative stress in the mechanisms of reparative osteogenesis in rats with an

open fracture of the mandible on the background of osteoporosis. *World of Medicine and Biology*. 2017 Nov;4(62):132-6.

160. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis. *World of Medicine and Biology*. 2018 Jan;1(63):109-12.

161. Likhitskyi OO, Goltsev AM. Influence of Cryopreserved Human Placental Tissue on Reparative Bone Formation in Rats with the Lower Jaw Open Fracture on Osteoporosis Background. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019 Jun;29(2):125-36.

162. Govindarajan P, Böcker W, El Khassawna T, Kampschulte M, Schlewitz G, Huerter B, Sommer U, Dürselen L, Ignatius A, Bauer N, Szalay G. Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *The American journal of pathology*. 2014 Mar 1;184(3):765-77.

163. Habermann B, Olender G, Eberhardt C, Augat P, Kurth AA. Strontium Ranelate and Teriparatid (PTH 1-34) Enhance Fracture Healing in Osteoporotic Sprague Dawley-Rats. In *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* 2008 Sep 1 (Vol. 23, pp. S206-S206). 2025 M ST, NW, STE 800, WASHINGTON, DC 20036-3309 USA: AMER SOC BONE & MINERAL RES.

164. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, Ignatius A. Mouse models in bone fracture healing research. *Current Molecular Biology Reports*. 2016 Jun 1;2(2):101-11.

165. Han NR, Park CL, Kim NR, Kim HY, Yoou MS, Nam SY, Moon PD, Jeong HJ, Kim HM. Protective effect of porcine placenta in a menopausal ovariectomized mouse. *Reproduction*. 2015 Sep 1;150(3):173-81.

166. He YX, Zhang G, Pan XH, Liu Z, Zheng LZ, Chan CW, Lee KM, Cao YP, Li G, Wei L, Hung LK. Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model. *Bone*. 2011 Jun 1;48(6):1388-400.

167. Hong JW, Lee WJ, Hahn SB, Kim BJ, Lew DH. The effect of human placenta extract in a wound healing model. *Annals of plastic surgery*. 2010 Jul 1;65(1):96-100.
168. Huppertz B, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Leepaz N, Orendi K, Pekarski I, Meiri H, Gonen R, Lubzens E. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants—a new way to explore drugs in pregnancy disorders. *Placenta*. 2011 Feb 1;32:S65-76.
169. Izzah Ibrahim N, Mohamad S, Mohamed N, Nazrun Shuid A. Experimental fracture protocols in assessments of potential agents for osteoporotic fracture healing using rodent models. *Current drug targets*. 2013 Dec 1;14(14):1642-50.
170. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor- β 1 to the bone. *Endocrine reviews*. 2005 Oct 1;26(6):743-74.
171. McIntyre JA, Jones IA, Danilkovich A, Vangsness Jr CT. The placenta: applications in orthopaedic sports medicine. *The American journal of sports medicine*. 2018 Jan;46(1):234-47.
172. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Abrahamsen B, Al-Daghri NM, Brandi ML, Cannata-Andia J, Cortet B, Dimai HP, Ferrari S, Hadji P. Identification and management of patients at increased risk of osteoporotic fracture: outcomes of an ESCEO expert consensus meeting. *Osteoporosis International*. 2017 Jul 1;28(7):2023-34.
173. Karpova NS, Abdulkadyrova KM, Selivanov EA, Balashova VA. Study of telomere length and colony-forming capability of cord blood hematopoietic stem cells during cryopreservation. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2011;6(4):42-7.
174. Kumar S, Wan C, Ramaswamy G, Clemens TL, Ponnazhagan S. Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Molecular Therapy*. 2010 May 1;18(5):1026-34.

175. Laurent R, Nallet A, Obert L, Nicod L, Gindraux F. Storage and qualification of viable intact human amniotic graft and technology transfer to a tissue bank. *Cell and tissue banking*. 2014 Jun 1;15(2):267-75.
176. Li WN, Xie QX, Qin JW, Huang W, Ye SE, Luo F, Zhang CX, Xiao LJ. Effect of mesenchymal stem cell transplantation on immunological injury of the ovary in mice. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2011 May;31(5):825-9.
177. Li Y, Tan Y, Zhang G, Yang B, Zhang J. Effects of calcitonin gene-related peptide on the expression and activity of nitric oxide synthase during mandibular bone healing in rabbits: an experimental study. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2009 Feb 1;67(2):273-9.
178. Liu W, Morschauser A, Zhang X, Lu X, Gleason J, He S, Chen HJ, Jankovic V, Ye Q, Labazzo K, Herzberg U. Human placenta-derived adherent cells induce tolerogenic immune responses. *Clinical & translational immunology*. 2014 May;3(5):e14.
179. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Sep 15;106(6):749-52.
180. Lykhytskyi OO. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas. *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2017 Oct;27(29):32-6.
181. Lykhytskyi OO. Modern views on etiopathogenesis of traumatic injuries of the lower jaw against the background of osteoporosis and the use of drugs for correction of the processes of reparative osteogenesis. *Reports of Vinnytsia National Medical University*. 2019 Jun;23(2):309-15.
182. Lykhytskyi OO. Study the influence of cryopreserved placenta on process of reparative bone regeneration. In present issue of «Medical Review» included abstracts of reports of 4th Annual International Scientific-Practical Conference «Medicine Pressing Questions» 2015 Oct; (Vol. 2, p. 42). Baku.

183. Likhitskyi OO. Efficiency of Combined Use of Cryopreserved Human Placenta Tissue and Calcium Citrate on Metabolism in Bone Tissue of Rats with Mandible Fracture on Background of Osteoporosis. In jurnal «Problems of Cryobiology and Cryomedicine» 2018 Jul; 2(Vol. 28, p. 177). Kharkiv.
184. Marini F, Cianferotti L, Brandi ML. Epigenetic mechanisms in bone biology and osteoporosis: can they drive therapeutic choices?. International journal of molecular sciences. 2016 Aug;17(8):13-29.
185. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011 Jun 1;42(6):551-5.
186. Mashiba T. Morphological analysis of bone dynamics and metabolic bone disease. Histological findings in animal fracture model--effects of osteoporosis treatment drugs on fracture healing process. Clinical calcium. 2011 Apr;21(4):551-8.
187. Murrell WD, Anz AW, Badsha H, Bennett WF, Boykin RE, Caplan AI. Regenerative treatments to enhance orthopedic surgical outcome. PM&R. 2015 Apr 1;7(4):S41-52.
188. Nardid OA, Pogozykh DN, Repina SV, Rozanova SL, Naumenko II, Rozanova ED. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta extracts. J Exp Integr Med. 2012 Jul 1;2(3):213-7.
189. Shankar AN, Shankar VN, Hegde N, Prasad R. The pattern of the maxillofacial fractures—a multicentre retrospective study. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2012 Dec 1;40(8):675-9.
190. Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. Bone. 2008 Jan 1;42(1):90-7.
191. Oh EJ, Kim TK, Shin JH, Choi JH, Chung HY. Biologic filler using human fibroblasts and placenta extracts. Journal of Craniofacial Surgery. 2011 Sep 1;22(5):1557-60.

192. Pilz GA, Ulrich C, Ruh M, Abele H, Schäfer R, Kluba T, Bühring HJ, Rolauffs B, Aicher WK. Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem cells and development*. 2011 Apr 1;20(4):635-46.
193. Pipino C, Shangaris P, Resca E, Zia S, Deprest J, Sebire NJ, David AL, Guillot PV, De Coppi P. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource?. *British medical bulletin*. 2013 Mar 1;105(1):43-68.
194. Prokopyuk VY, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terehova EA, Volina VV. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. *Клітинна та органна трансплантологія*. 2015(3,№ 1):34-8.
195. Robbins JA, Aragaki A, Crandall CJ, Manson JE, Carbone L, Jackson R, Lewis CE, Johnson KC, Sarto G, Stefanick ML, Wactawski-Wende J. Women's Health Initiative Clinical Trials: Interaction of calcium plus vitamin D and Hormone Therapy. *Menopause (New York, NY)*. 2014 Feb;21(2):116.
196. Robin C, Bollerot K, Mendes S, Haak E, Crisan M, Cerisoli F, Lauw I, Kaimakis P, Jorna R, Vermeulen M, Kayser M. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell stem cell*. 2009 Oct 2;5(4):385-95.
197. Roselli EA, Lazzati S, Iseppon F, Manganini M, Marcato L, Gariboldi MB, Maggi F, Grati FR, Simoni G. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy*. 2013 Nov 1;15(11):1340-51.
198. Roux C, Bischoff-Ferrari HA, Papapoulos SE, de Papp AE, West JA, Bouillon R. New insights into the role of vitamin D and calcium in osteoporosis management: an expert roundtable discussion. *Current medical research and opinion*. 2008 May 1;24(5):1363-70.

199. Rouzi AA, Al-Sibiani SA, Al-Senani NS, Radaddi RM, Ardawi MS. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures among healthy Saudi postmenopausal women: the CEOR Study. *Bone*. 2012 Mar 1;50(3):713-22.
200. Roy R, Brodarac A, Kukucka M, Kurtz A, Becher PM, Jülke K, Choi YH, Pinzur L, Chajut A, Tschöpe C, Stamm C. Cardioprotection by placenta-derived stromal cells in a murine myocardial infarction model. *Journal of Surgical Research*. 2013 Nov 1;185(1):70-83.
201. Rozanova SL, Naumenko EI, Rozanova ED, Nardid OA. Change of antioxidative properties of human placental extracts after freezing. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2010 Sep 20;20(3):288-96.
202. Saito M. Poor bone quality in diabetes and arteriosclerosis. *Clinical calcium*. 2009 Sep;19(9):1257-68.
203. Sanchez PA, Zhao H, Abdelhamid AI, Warburton D. Impact of stem cells in craniofacial regenerative medicine. *Frontiers in physiology*. 2012 Jun 21;3:188.
204. Serikov V, Kuypers F. Human term placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2008;3:51-6.
205. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko G, Tsupykov O, Klymenko P, Kuchuk O, Gabrielyan A, Domanskiy T, Onishchenko V, Lukash L. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2012 Jun 18;22(2):157-60.
206. Schevchenko NO, Somova KV, Volina VV, Prokopiuk VYu PO. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. *Morphologia*. 2016;10(2):93-8.
207. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015 Oct 19;3:162.

208. Chua LS, O'Connell J, Kang S, Burks J, Jayanetti C, Pereda JC, Reiss I. An Open Label Prospective Pilot Study to Evaluate the Efficacy of Cryopreserved Amniotic Tissue Grafts for Chronic Nonhealing Ulcers. *WOUNDS-A COMPENDIUM OF CLINICAL RESEARCH AND PRACTICE*. 2014 May 1;26(5):E30-8.
209. Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbeck's archives of surgery*. 2010 Feb 1;395(2):163-72.
210. Tai V, Leung W, Grey A, Reid IR, Bolland MJ. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2015 Sep 29;351:h4183.
211. Taylor CL, Sempos CT, Davis CD, Brannon PM. Vitamin D: moving forward to address emerging science. *Nutrients*. 2017 Dec;9(12):130-8.
212. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 2009 Jul 1;5(3):143-54.
213. Thomasen H, Pauklin M, Noelle B, Geerling G, Vetter J, Steven P, Steuhl KP, Meller D. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Current eye research*. 2011 Mar 1;36(3):247-55.
214. Thomasen H, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2009 Dec 1;247(12):1691-700.
215. Tiedemann G, Sethe SC. Regulatory frameworks for cell and tissue based therapies in Europe and the USA. In *Regenerative Medicine 2013* (pp. 1139-1171). Springer, Dordrecht.
216. Tilman DR. Osteoporosis: Now and the future. *Lancet*. 2011;377:1276-87.

217. Tu KN, Lie JD, Wan CK, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, Van K, Hyun D. Osteoporosis: a review of treatment options. *Pharmacy and Therapeutics*. 2018 Feb;43(2):92-104.
218. Van Linthout S, Hamdani N, Miteva K, Koschel A, Müller I, Pinzur L, Aberman Z, Pappritz K, Linke WA, Tschöpe C. Placenta-derived adherent stromal cells improve diabetes mellitus-associated left ventricular diastolic performance. *Stem cells translational medicine*. 2017 Dec;6(12):2135-45.
219. Werber B, Martin E. A prospective study of 20 foot and ankle wounds treated with cryopreserved amniotic membrane and fluid allograft. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 2013 Sep 1;52(5):615-21.
220. Zhao JG, Zeng XT, Wang J, Liu L. Association between calcium or vitamin D supplementation and fracture incidence in community-dwelling older adults: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2017 Dec 26;318(24):2466-82.
221. Zhou HH, Liu Q, Cheng G, Li ZB. Aetiology, pattern and treatment of mandibular condylar fractures in 549 patients: a 22-year retrospective study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2013 Jan 1;41(1):34-41.

ДОДАТКИ

Додаток А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНО ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Лихицкий АА. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти. Клінічна стоматологія. 2016 Лют;1(14):37-41.
2. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. The role of immune-inflammatory processes and oxidative stress in the mechanisms of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis. World of Medicine and Biology. 2017 Nov;4(62):132-6.
3. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Rengenological features of morphogenesis of regenerate in rats with open fracture of lower jaw with osteoporosis which receipted the calcium citrate with improvement of cryoplacenta. Reports of Morphology. 2017 Oct; 2(23):248-52.
4. Lykhytskyi OO. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2017 Oct;27(29):32-6.
5. Goltsev AM, Lykhytskyi OO. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis. World of Medicine and Biology. 2018 Jan;1(63):109-12.
6. Likhitskyi OO, Goltsev AM. Influence of Cryopreserved Human Placental Tissue on Reparative Bone Formation in Rats with the Lower Jaw Open Fracture on Osteoporosis Background. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019 Jun;29(2):125-36.

7. Lykhytskyi OO. Modern views on etiopathogenesis of traumatic injuries of the lower jaw against the background of osteoporosis and the use of drugs for correction of the processes of reparative osteogenesis. Reports of Vinnytsia National Medical University. 2019 Jun;23(2):309-15.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

8. Лихицкий АА. Репаративная регенерация костной ткани под влиянием криоконсервированной плаценты. В журнале «Проблемы криобиологии и криомедицины» 2014 Май; 2(Том 24, стр. 170). Харьков.

9. Lykhytskyi OO. Study the influence of cryopreserved placenta on process of reparative bone regeneration. In present issue of «Medical Review» included abstracts of reports of 4th Annual International Scientific-Practical Conference «Medicine Pressing Questions» 2015 Oct; (Vol. 2, p. 42). Baku.

10. Ліхницький ОО. Особливості репаративного остеогенезу в експерименті при відкритому переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу після імплантації кріоконсервованої тканини плаценти людини. В збірнику тез «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» 2018 січ. (стор. 111-114). Львів, ГО «Львівська медична спільнота».

11. Likhitskyi OO. Efficiency of Combined Use of Cryopreserved Human Placenta Tissue and Calcium Citrate on Metabolism in Bone Tissue of Rats with Mandible Fracture on Background of Osteoporosis. In jurnal «Problems of Cryobiology and Cryomedicine» 2018 Jul; 2(Vol. 28, p. 177). Kharkiv.

Апробація результатів дисертації:

- конференція молодих вчених «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (м. Харків, 2014) – стендова доповідь і публікація;
- 4-а щорічна науково-практична конференція «Medicine Pressing Questions» (м. Баку, 2015) – стендова доповідь і публікація;

- науково-практична конференція «Прикладні аспекти морфології», присвячена пам'яті професорів-морфологів Г. В. Терентьєва, О. Ю. Роменського, Б. Й. Когана, П. П. Шапаренка, С. П. Жученка (м. Вінниця, 2017) – усна доповідь;
- міжнародна науково-практична конференція «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» (м. Львів, 2018) – публікація;
- міжнародна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2018» (м. Харків, 2018) – усна доповідь і публікація.

Додаток Б1

«Затверджую»

Проректор з науково-педагогічної
(навчальної) роботи
д-мед.н., проф.

Гумінський Ю. Й.

«23»

10

2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: «Експериментальне обґрунтування застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи»

1. Автор: Ліхницький Олексій Олексійович, асистент кафедри хірургії №2 з курсом «Основи стоматології», Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Досліджено та оцінено ефективність і вплив комбінованого застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини і цитрату кальцію на метаболізм кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів з відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Результати проведених досліджень свідчать про остеопротекторну дію препарату кріоконсервованої тканини плаценти людини за умов модельованої патології, яка виявляється в посиленні процесів колагеноутворення (максимум на 21 добу, вміст в крові пептидозв'язаного оксипроліну в 2 та 3 групі достовірно перевищує на 21,4 та 35,2% відповідні показники в контролі), мінералізації кісткової тканини (на 14 добу в 2 та 3 групі тварин індекс мінералізації статистично значуще перевищував на 31,7 та 55,3% показники в контрольній групі), а також депримує вплив на остеодеструктивні процеси (максимум на 14 добу в 2 та 3 групі тварин активність кислої фосфатази в сироватці крові була достовірно меншою відповідно на 12,7 та 22,8%, порівняно з контролем) та катаболізм колагену (станом на 14 та 21 добу рівень вільного оксипроліну в сироватці крові був меншим відповідно на 41,8 та 23,6% (в 2 групі), а також на 51,8 та 29,5% (в 3 групі), порівняно з контролем). Комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та препарату кальцій цитрату володіє більш потужною остеопротекторною дією, яка до того ж розвивається на більш ранніх термінах експерименту.

3. Актуальність дослідження: Методи стимуляції репаративного остеогенезу при змодельованих травмах (переломах) нижньої щелепи, в тому числі на тлі остеопорозу, проводяться у напрямку ліквідації наслідків запальної і судинної реакції, біохімічних зрушень, порушення системного та локального імунного гомеостазу за допомогою використання кріоконсервованої тканини плаценти.

В якості коректорів вказаних біологічних та імунологічних чинників нами обрано кріоконсервовану плаценту «Платекс – плацентарний» (виробник ДП «МНЦ кріобіології і кріомедицини НАН, МОЗ, АМН України, м. Харків) та кальцію цитрат ВАР "Фармак", м.Київ, Україна (виробник "Dr.Paul Lohmann GmbH KG Chemische Fabrik", Німеччина).

4. Установа-розробник: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

5. Джерела інформації:

1. Goltsev A. M. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2018. – №1 (63). – P. 109-112.
2. Lykhytskyi O. O. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas / O. O. Lykhytskyi // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2017. – № 29. – P. 32-36.
3. Лихицкий А. А. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти / А. А. Лихицкий // Клінічна стоматологія. – 2016. – № 1. – С. 37-41.

6. Ким і коли впроваджено:

кафедра гістології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова

Початок впровадження: з 2018 - 2019 н.р.

Протокол засідання кафедри № 3 від 19 10 2018р.

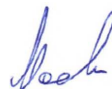
7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри гістології.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри гістології,

д.мед.н., проф.



О.С. Масівський

Додаток Б2

«Затверджую»
 Проректор з науково-педагогічної
 (навчальної) роботи
 д.мед.н., проф.  Гумінський Ю. Й.
 10 _____ 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: «Експериментальне обґрунтування застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи»

1. Автор: Ліхницький Олексій Олексійович, асистент кафедри хірургії №2 з курсом «Основи стоматології», Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: В експерименті досліджено ефективність та вплив кріоконсервованої тканини плаценти людини і цитрату кальцію на метаболізм кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів з відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Вперше показано, що сумісне використання кріоконсервованої тканини плаценти та препарату кальцію цитрат у щурів з відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу коригує ряд метаболічних та імунологічних процесів, а саме зменшує деградацію колагену на 7-21 добу; збільшує активність колагенотворення на 14-30 добу; підвищує індекс мінералізації кісткової тканини на 7-30 добу; відновлює баланс в системі проантиоксидантних ензимів, що супрЯжено зі сповільненням активності вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, нітрозативного стресу на 7-21 добу; зменшує рівень прозапальних цитокінів ФНП-α, ІЛ-8 на 7-21 добу; збільшує вміст ангіогенного чинника VEGF та фак-тора росту ТФР-β1 на 14-30 добу після травми.

3. Актуальність дослідження: Виявлені закономірності в значній мірі розширяють погляд на механізми дії кріоконсервованої тканини плаценти у зоні травми, що дозволить цілеспрямовано впливати на репаративний остеогенез, оптимізувати процеси зрощення, скоротити строки лікування, та обґрунтує можливість її використання в клінічній практиці при даній патології.

Проведені дослідження розкривають перспективність використання кріоконсервованої тканини плаценти у сполученні з препаратом кальцію цитрат при травматичних ушкодженнях кісткової тканини як взагалі, так і, і зокрема кісток нижньої щелепи.

4. Установа-розробник: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

5. Джерела інформації:

1. Goltsev A. M. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2018. – №1 (63). – P. 109-112.

2. A. Goltsev A. M. The role of immune-inflammatory processes and oxidative stress in the mechanisms of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2017. – №4 (62). – P. 132-136.
3. Lykhytskyi O. O. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas / O. O. Lykhytskyi // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2017. – № 29. – P. 32-36.

6. Ким і коли впроваджено:

кафедра фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова

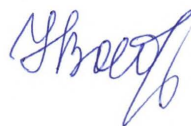
Початок впровадження: з 2018 - 2019 н.р.

Протокол засідання кафедри № 3 від 12.10. 2018р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри фармакології.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фармакології,
д.мед.н., проф.



Н.І. Волощук

Додаток Б3

«Затверджую»

Проректор з науково-педагогічної
(навчальної) роботи

д.мед.н., проф.

Гумінський Ю. Й.



2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: «Експериментальне обґрунтування застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи»

1. Автор: Ліхницький Олексій Олексійович, асистент кафедри хірургії №2 з курсом «Основи стоматології», Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Дані рентгенографічних досліджень, проведених досліджень сумісного використання кріоконсервованої тканини плаценти людини і цитрату кальцію встановлено стимулюючий вплив кріоконсервованої тканини плаценти на процеси проліферації та диференціювання клітинних та тканинних компонентів регенерату кістки і виявило наявність загальних закономірностей у перебігу репаративного процесу. Вони виявлялися первинною тканинною реакцією у вигляді остеопорозу, вторинно розвиненим запаленням у вигляді деструктивних змін, частіше в дистальному уламку щелепи і по нижньому краю кортикальної пластинки ложа різця, резорбцією альвеолярного відростка з оголенням коренів зубів і періоститом. Спостерігалися також відмежування вогнища деструкції в уламках щелепи і ділянках резорбції альвеолярного відростка. Про це свідчить поява чіткості країв і збільшення площини кістки на межі деструктивних ділянок, ознак остеосклерозу, а також відмежування секвестрів і зменшення реакції періосту.

3. Актуальність дослідження: Досягнення найбільш оптимального співвідношення між швидкістю проліферативних процесів, диференціювання остеогенних клітинних елементів в остеобласти і фібриноутворення можна отримати при комбінованому застосуванні препаратів кріоконсервованої тканини плаценти людини і препаратів кальцію. Пошук вирішення цього багатогранного завдання можливий за умови моделювання на тваринах конкретної клінічної ситуації.

4. Установа-розробник: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

5. Джерела інформації:

1. Goltsev A. M. Rengenological features of morphogenesis of regenerate in rats with open fracture of lower jaw with osteoporosis which receipted the calcium citrate with improvement of cryoplacenta / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // Вісник морфології. – 2017. – Том 23, № 2. – С. 248-252.
2. Lykhytskyi O. O. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of

cryopreserved tissue of human placent / O. O. Lykhytskyi // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2017. – № 29. – P. 32-36.

3. Goltsev A. M. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2018. – №1 (63). – P. 109-112.

6. Ким і коли впроваджено:

кафедра променевої діагностики, променевої терапії та онкології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова

Початок впровадження: з 2018 - 2019 н.р.

Протокол засідання кафедри № 2 від 19 09 2018р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри променевої діагностики, променевої терапії та онкології.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри променевої діагностики,
променевої терапії та онкології
д.мед.н., проф.



О.Г. Костюк

Додаток Б4

«Затверджую»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи, член-кореспондент НАПН України, д. мед. н., проф.

Цехмістер Я.В.

_____ 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: «Експериментальне обґрунтування застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи»

1. Автор: Ліхницький Олексій Олексійович, асистент кафедри хірургії №2 з курсом «Основи стоматології», Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Експериментально було досліджено ефективність та вплив кріоконсервованої тканини плаценти людини і цитрату кальцію на метаболізм кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів з відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Вперше показано, що спільне використання кріоконсервованої тканини плаценти та препарату кальцію цитрат у щурів з відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу коригує ряд метаболічних та імунологічних процесів, а саме зменшує деградацію колагену на 7-21 добу; збільшує активність колагенуутворення на 14-30 добу; підвищує індекс мінералізації кісткової тканини на 7-30 добу; відновлює баланс в системі проантиоксидантних ензимів, що супражено зі сповільненням активності вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, нітрозативного стресу на 7-21 добу; зменшує рівень прозапальних цитокінів ФНП- α , IL-8 на 7-21 добу; збільшує вміст ангіогенного чинника VEGF та фактора росту ТФР- β 1 на 14-30 добу після травми.

3. Актуальність дослідження: Проведені дослідження розкривають перспективність використання кріоконсервованої тканини плаценти у сполученні з препаратом кальцію цитрат при травматичних ушкодженнях кісткової тканини як взагалі, так і, і зокрема кісток нижньої щелепи.

Виявлені закономірності в значній мірі розширяють погляд на механізми дії кріоконсервованої тканини плаценти у зоні травми, що дозволить цілеспрямовано впливати на репаративний остеогенез, оптимізувати процеси зрощення, скоротити строки лікування, та обґрунтує можливість її використання в клінічній практиці при даній патології.

4. Установа-розробник: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

5. Джерела інформації:

Lykhytskyi O. O. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of

cryopreserved tissue of human placentas / O. O. Lykhytskyi // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2017. – № 29. – P. 32-36.

Лихицкий А. А. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти / А. А. Лихицкий // Клінічна стоматологія. – 2016. – № 1. – С. 37-41.

Goltsev A. M. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2018. – №1 (63). – P. 109-112.

6. Ким і коли впроваджено:

Кафедра гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

Початок впровадження: квітень 2018 р.

Протокол засідання кафедри № 4 від 10 вересня 2018р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес - лекційний курс.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри гістології

та ембріології,

член-кореспондент НАМН України,

д.мед.н., проф.



Ю.Б. Чайковський

Додаток Б5

«Затверджую»

Перший проректор Української медичної
стоматологічної академії

д.мед.н. проф.

В.М.Дворник

2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: «Експериментальне обґрунтування застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи»

2. Установа розробник, автор: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, асистент кафедри хірургії №2 з курсом «Основи стоматології» **Ліхницький Олексій Олексійович.**

3. Джерела інформації:

1. Goltsev A. M. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2018. – №1 (63). – P. 109-112.
2. Лихицкий А. А. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти / А. А. Лихицкий // Клінічна стоматологія. – 2016. – № 1. – С. 37-41.
3. Lykhytskyi O. O. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas / O. O. Lykhytskyi // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2017. – № 29. – P. 32-36.

4.Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра гістології, цитології та ембріології Української медичної стоматологічної академії

5. Термін впровадження: березень 2018 року

6. Форма впровадження: у навчальний процес – в матеріали лекцій та практичних занять при викладенні теми «Розвиток кісткової тканини», в наукову роботу кафедри.

7. Суть впровадження: Результати проведених досліджень свідчать про остеопротекторну дію препарату кріоконсервованої тканини плаценти людини за умов модельованої патології, яка виявляється в посиленні процесів колагенотворення, мінералізації кісткової тканини, а також депримує вплив на остеодеструктивні процеси Комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та препарату кальцій цитрату володіє більш потужною остеопротекторною дією ніж за умов монотерапії.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Пропозиція для впровадження обговорена на засіданні кафедри гістології, цитології та ембріології. Протокол засідання кафедри №2 від 11 вересня 2018р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології д.мед.н., проф.

В. І. Шепітько

ПІДПИС ЗАСІДЧОЮ
Начальник відділу кадрів
З. Г. Бойко

Додаток Б6

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
ДВНЗ «Тернопільський державний
медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»
д. біол. н., проф.  Кліщ І. М.
« 27 » 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. *Пропозиція для впровадження:* «Експериментальне обґрунтування застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи».

2. *Установа-розробник, автор:* Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Ліхницький Олексій Олексійович – асистент кафедри хірургії №2 з курсом «Основи стоматології» Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

3. *Джерела інформації:*

1. Лихицкий А. А. Влияние криоконсервированной плацентарной ткани на остеогенез в эксперименте при переломе нижней челюсти / А. А. Лихицкий // Клінічна стоматологія. – 2016. – № 1. – С. 37-41.

2. Lykhytskyi O. O. Histological features of morphogenesis of regenerate in rats with open lower jaw fracture on the background of osteoporosis after implantation of cryopreserved tissue of human placentas / O. O. Lykhytskyi // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2017. – № 29. – P. 32-36.

3. Goltsev A. M. Prognosis of reparative osteogenesis in rats with open mandibular fracture on the background of osteoporosis / A. M. Goltsev, O. O. Lykhytskyi // World of Medicine and Biology. – 2018. – №1 (63). – P. 109-112.

4. *Базова установа, яка проводить впровадження:* кафедра гістології та ембріології ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України».

5. *Форма впровадження:* результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

6. *Термін впровадження:* квітень 2018 року.

7. *Суть впровадження:* матеріали, що подаються дисертантом, мають теоретичне та практичне значення для розуміння особливостей застосування препарату кріоплаценти для корекції процесів репаративного остеогенезу нижньої щелепи.

8. *Зауваження та пропозиції:* немає

9. *Протокол засідання кафедри № 3 від 23 березня 2018 р.*

Завідувач кафедри гістології та ембріології
ДВНЗ «Тернопільський державний
медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»
доктор біологічних наук, професор

 К. С. Волков