

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я.ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДЖИВАК ВОЛОДИМИР ГЕОРГІЙОВИЧ

УДК: 616.74-001: [611.018.52/.54+611.013.395]-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ
ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ
ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ КРОВІ І
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ КОРЕКЦІЇ
ТРАВМАТИЧНИХ УШКОДЖЕНЬ М'ЯЗІВ

222 – Медицина

22-Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ Дживак В.Г.

Науковий керівник: Кліщ Іван Миколайович, доктор біологічних наук,
професор

Тернопіль – 2021

АНОТАЦІЯ

Дживак В.Г. Патогенетичне обґрунтування застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2021

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2021

В дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання, що виявляється у взаємозв'язку морфологічних змін у м'язовій тканині скелетних м'язів із змінами на місцевому та системному рівнях за умов експериментального травматичного ушкодження м'язів та при корекції збагаченою тромбоцитами плазмою (PRP) та мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК) в ранньому та пізньому посттравматичному періодах, та вивчення впливу PRP на проліферативну активність фіброblastів, міогенних клітин та мезенхімальних стовбурових клітин пуповини щурів в умовах *in vitro*.

На першому етапі дослідження проведено порівняльне вивчення впливу PRP на проліферативну активність фіброblastів, міогенних клітин та МСК пуповини щурів в умовах *in vitro*.

Експериментальне дослідження виконано на 132 нелінійних білих щурах масою 180–210 г з дотриманням норм загальних правил та положень про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей за умов тіопентал-натрієвого знечулення (40 мкг на 1 кг). Вивчали ранній та пізній посттравматичний періоди тому тварин виводили на 1-шу, 7-му, 14-ту, 21-шу доби з експерименту.

Моделювали травматичне ушкодження м'язів у групі піддослідних тварин шляхом нанесення однократного дозованого удару по м'язу спеціально розробленим пристроєм з діаметром 1 см² та енергією 0,61 Дж.

В умовах травматичного ушкодження м'язів стегна гіперактивація процесів ліпідної пероксидації спостерігається вже на 1-шу добу, зростаючи до 7-ої доби посттравматичного періоду порівняно з тваринами без змодельованої патології.

За умови корекції PRP та МСК відбувалось пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що вело до зниження рівня продуктів ПОЛ та зростання активності ферментів антиоксидантної системи та супроводжувалась зменшенням оксидативного ушкодження міоцитів.

Отримані в результаті експериментального дослідження дані впливу травматичного ушкодження м'язу свідчать про те, що в результаті розвивається ендотоксикоз, свідченням чого є нагромадження ендотоксинів в організмі тварин, на що вказують виражені зміни показників ендогенної інтоксикації – еритроцитарного та лейкоцитарного індексів інтоксикації та вмісту молекул середньої маси (МСМ). Найбільш виражені зміни щодо вмісту обох фракцій МСМ спостерігали через добу з моменту травми та залишалися вищими за показники інтактних до 21-ої доби посттравматичного періоду.

У роботі автор зосереджує увагу на вивченні ефективності збагаченої тромбоцитами плазма крові у загоєнні м'язових пошкоджень, ґрунтуючись на наявності факторів росту та цитокінів, які регулюють процеси відновлення й репарації різних тканин організму, включаючи регуляцію міграції та проліферації клітин, ангіогенез, управління процесом запалення та синтезу колагену.

Автор використовує МСК для корекції травматичного ушкоджень м'язів та оцінює їх ефективність, враховуючи дані, що різні типи стовбурових та клітин-попередників в сукупності впливають на регенерацію м'язів, безпосередньо шляхом диференціювання в м'язові клітини, або вивільнення

паракринових факторів (факторів росту, цитокінів), які контролюють регенеративну реакцію.

При травматичному ушкодженні м'язів показники прозапальних цитокінів сироватки крові у щурів, яким моделювали травму м'язів, були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології: концентрація IL-1 β на 1-шу добу після нанесення травми був достовірно вищою від показника тварин без змодельованої патології у 2,4 рази; показник TNF- α - у 2,6 рази, а IL6 – у 2,4 рази відповідно. Аналізуючи динаміку зміни концентрації прозапальних цитокінів варто відмітити їх односпрямованість, зокрема, максимальне зростання на першу добу, незначне зниження та коливання практично на одному рівні протягом 7-ми – 14-ти діб та зниження до 21-ої доби.

При травматичному ушкодженні м'язів відбувається збільшення кількості та активності ферментів протеолізу, що веде до «протеазного вибуху». Так, лізис азоальбуміну на першу добу після нанесення травми був достовірно вищим від показника тварин без змодельованої патології у 7,6 рази, показник лізису азоказеїну у цей термін спостереження був у 10,3, а лізис азоколу – у 7,7 разів вищим, ніж у тварин, яким травми не моделювали. Однією з причин, які зумовлюють цю трансформацію, є зниження активності ендогенних інгібіторів протеїназ і підвищення проникності лізосомальних мембран. Проте, однією з найбільш важливих ланок контролю за протеолізом є вміст у крові та тканинах специфічних білків і інгібіторів протеолітичних ферментів, зокрема α 1-інгібітора протеїназ, α 2-макроглобуліну, антитромбіну III, α 2-антиплазміну, α 1-антихімотрипсину, які утворюють комплекси з протеїназами, знижуючи при цьому їх активність у тварин з механічною травмою м'язів стегна спостерігається інтенсивне зростання протеолітичної активності крові на тлі менш виразного зростання антипротеазної активності, а також зростання проникності лізосомальних мембран. Це призводить до значного дисбалансу у системі протеази/антипротеази і зростання індексу протеолізу.

Встановлено, що застосування коригуючого чинника супроводжувалось суттєвим зсувом співвідношення протеази/інгібітори протеаз у бік переважання

процесів інгібування протеолізу, що може мати суттєве значення для пришвидшення процесів регенерації м'язової тканини, ушкодженої внаслідок механічної травми.

Викликані зміни зумовлюють розвиток деструктивних і запальних змін у всьому організмі, які підтверджуються гістологічно. Автор вказує на гістологічні та морфометричні зміни м'язів на 1-шу добу раннього посттравматичного періоді при моделюванні травматичного ушкодженні м'язів в ділянці пошкодження, які полягали в гострих розладах кровообігу з вогнищевим руйнуванням судин, зруйнованих м'язах, просочених еритроцитами, набряк оточуючих волокон, тканинні детрити, незначну кількість лімфо- та гістіоцитів, тучних клітини, поодинокі сегментоядерні лейкоцити та значну кількість фібрину. В легенях наростали розлади кровообігу у поєднанні із помірною лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією строми до 14-ої доби і дещо зменшувались до 21-ої доби. В печінці порушувалась часточкова структура, наростали виражені дистрофічні зміни переважно до 14-ої доби і дещо зменшувались прояви до 21-ої доби. В нирках наростали розлади кровообігу як в кірковому так і в мозковому шарі, виникали дистрофічні зміни епітелію вивідних каналців.

При морфометричному аналізі м'язових волокон на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язу встановили, що площа ушкоджених м'язів переважала площу неушкоджених тканин. Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження показало, що при травматичному ушкодженні м'язів в м'язових структурах переважали явища набряку та пошкодження тканини. Місцями навколо м'язів спостерігались фрагменти колагенових волокон із ознаками мукоїдного набряку, дещо хаотичного ходу фібрил, серед яких визначались еритроцити, лімфоцити та лейкоцити.

При застосуванні PRP на 1-шу добу спостереження було виявлено в ділянці пошкодження розширення та повнокров'я судин, гостру запальну реакцію навколо судинної стінки, проте значний периваскулярний набряк строми не візуалізувався. В пошкоджених м'язах візуалізувались некротичні

зміни. Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів була незначною, а кількість ушкоджених м'язових волокон переважала, однак показник був на 10 % меншим, ніж у тварин яким не проводилась корекція. Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження м'язів на фоні корекції PRP встановило, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів візуалізувався виражений набряк строми, насичений мізерними фракціями колагенових волокон, які розташовувались переважно хаотично.

За умов корекції PRP на 14-ту та 21-шу добу експерименту покращувалось відновлення м'язових волокон у тварин за рахунок зменшення кількості пошкоджених волокон, збільшення кількості регенеруючих волокон, зменшенням проявів запальної реакції, набряку та ущільнення колагенової строми в ділянці пошкодження.

Застосування МСК проявляє більш загальний протекторний вплив на структуру пошкоджених переважно епітеліальних структур паренхіматозних органів.

Застосування МСК на моделі травматичного ушкодження м'язів на 1-шу добу в ділянці травмування було виявлено переважно повнокров'я судин у поєднанні із гострою запальною реакцією навколо судинної стінки, у поєднанні із периваскулярним набряком. Морфометрично виявлено, що площа неушкоджених м'язів практично не відрізнялась від групи досліджень при корекції PRP, а кількість ушкоджених м'язових волокон дещо переважала.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше вивчено вплив PRP на проліферативну активність фібробластів, міогенних клітин та мезенхімальних стовбурових клітин пуповини щурів в умовах *in vitro*. Встановлено, що багата тромбоцитами плазма має виражений мітогенний вплив на мезенхімальні клітини, значний протизапальний ефект та виражену стимулюючу дію на проліферативну активність фібробластів, але менш ефективна у випадку клітинної культури мезенхімальних стовбурових клітин.

Вперше встановлено, що за умов експериментальної корекції з використанням PRP відбувається пригнічення перекисного окислення ліпідів та зростання активності ферментів антиоксидантної системи.

Вперше доведено, що моделювання травми м'язів супроводжувалося зростанням концентрації прозапальних цитокінів IL-1 β TNF- α IL-6 з максимальним зростанням на першу добу, стабільним підвищенням протягом 7-ої – 14-ої діб та зниженням до 21-ої доби.

Доведено, що травматичні ушкодження м'язів спричинює розвиток ендотоксикозу, який проявляється накопиченням ендотоксинів в організмі, що підтверджується суттєвими змінами показників ендогенної інтоксикації: еритроцитарних та лейкоцитарних індексів інтоксикації та вмісту молекул середньої маси.

Встановлено, що у тварин з експериментальним травматичним ушкодженням м'язів стегна спостерігається інтенсивне зростання протеолітичної активності крові на тлі менш виразного зростання антипротеазної активності, а також зростання проникності лізосомальних мембран, що призводить до значного дисбалансу у системі протеази/антипротеази і зростання індексу протеолізу.

Вперше гістологічно та морфометрично показана сукупність порушень у м'язах після нанесення травми та доведений протизапальний та регенераторний вплив застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальних стовбурових клітин.

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів встановлено, що на 1-шу добу експерименту у досліджуваних нами органах розвиваються дистрофічні зміни у всіх епітеліальних компонентах, проте найбільш вираженими вони є в печінці та легенях.

Застосування PRP та МСК має в різній мірі протекторний ефект уже із 1-ої доби застосування. Застосування PRP проявляє переважно місцевий вплив для корекції загоєння травматичного ушкодження м'язів, покращує відновлення структур в ділянці рани та має поверхневий вплив на відновлення

епітеліального компоненту паренхіматозних органах, переважно у віддалені періоди.

Практичне значення отриманих результатів. Результати досліджень доповнюють та уточнюють наукові дані щодо патогенетичних особливостей системних і локальних порушень при травматичному ушкодження м'язів. Посилення процесів ліпідної пероксидації, розвиток ендотоксикозу, дисбаланс у системі протеаз\антипротеаз, зростання вмісту в сироватці крові прозапальних цитокінів є ключовими факторами, які визначають тяжкість системних порушень. Доведення автором позитивного впливу на процеси репарації, зниження тяжкості запалення та зменшення системних проявів ушкодження м'язів збагаченої тромбоцитами плазми та стовбурових клітин є теоретичним підґрунтям для застосування даних засобів у клініці, що вимагає свого подальшого доклінічного вивчення.

Отримані результати роботи впроваджені в практику наукових досліджень та навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології, медичної біохімії, фізіології з основами біобезпеки, військової медицини та медицини катастроф Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського та на кафедрах медицини катастроф та військової медицини, патологічної фізіології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» МОЗ України.

Ключові слова: травматичне ушкодження, м'язи, збагачена тромбоцитами плазма крові, мезенхімальні стовбурові клітини, експеримент, оксидативний стрес, цитокіни, протеїнази/інгібітори протеїназ, ендогенна інтоксикація.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Dzhyvak V. H., Khlibovska O. I., Klishch I. M. Role of endogenic intoxication in muscle injury in experiment. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2019. Vol. 5, № 2. P. 122–127.
2. Морфофункціональні зміни в легенях та печінці у ранній період після травматичного ураження м'язів в експерименті / В. Г. Дживак, І. М. Кліщ, Т. В. Дацко, О. І. Хлібовська. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 1. С. 74–77.
3. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Особливості цитокінового профілю у сироватці крові щурів за умови корекції травми м'язів збагаченою тромбоцитами плазмою крові. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2020. № 3. С. 53–58.
4. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на стан системи протеїнази/інгібітори протеїназ при травматичному ураженні м'язів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 3. С. 72–80.
5. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Ефективність збагаченої тромбоцитами плазми крові в індукції загоєння м'язової тканини в експериментальному дослідженні. *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*. 2020. № 3 (91). С. 36–43.
6. Influence of PRP on morphological changes in muscle in the early period after traumatic muscle injury in the experiment / V. Dzhyvak, I. Klishch, T. Datsko, O. Khlibovska. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 6. P. 171–178.
7. Research of stimulating efficiency of blood allogeneic plasma fractions on cell proliferation in vitro conditions / V. G. Dzhyvak, A. I. Dovhalyuk, I. R. Paliy, I. M. Klishch. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 8. P. 559–569.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Травматичне ураження м'язової тканини та роль збагаченої тромбоцитами плазми. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXI наук.-практ. конф. , 7 червня 2018 р. Тернопіль, 2018. С. 223–224.

9. Dzhyvak V. The level of tba – active products under the conditions of traumatic muscle damage. *Матеріали XXIII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 15–17 квітня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 308–309.

10. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Антиоксидантна система захисту при експериментальній травмі м'язів. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXII наук.-практ. конф., присв. 165-річчю від дня народження І. Я. Горбачевського, 13 червня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 84.

11. Дживак В. Особливості морфологічних змін у легенях, нирці, печінці у посттравматичному періоді травматичного ураження м'язів стегна в експерименті. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 211.

12. Дживак В. Рівень активності ред-окс системи у різних групах щурів з травматичним ушкодженням м'язів в експерименті під впливом збагаченої тромбоцитами плазми крові. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 211-212.

13. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на проліферативну активність клітинних культур / В. Г. Дживак, А. І. Довгалюк, І. Р. Палій, І. М. Кліщ. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 червня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 58.

14. Дживак В. Г. Особливості методики отримання плазми, збагаченої тромбоцитами. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 278–279.

15. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Динаміка показників протеїназо/інгібіторної системи крові при травматичному ураженні м'язів в експерименті. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали XII Всеукраїнської наук.-практ. конф., присв. Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології 110-річчю проф. Бергера Е. Н. і 90-річчю проф. Маркової О. О. Галицькі читання II, 29–30 жовтня 2020 р. м. Тернопіль, 2020. С. 40–41.

ANNOTATION

Dzhyvak V. H. The pathogenetic rationale for the use of platelet-rich blood plasma and stem cells for traumatic muscle injuries correction. – Qualifying scientific work as a manuscript.

The thesis for the degree of the Doctor of Philosophy (PhD) on a specialty 222 «Medicine» (22 «Health care»). – I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, 2021.

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2021.

The thesis presents a theoretical generalization and a new solution of the current scientific problem, which is manifested in the relationship of morphological changes in skeletal muscle tissue with changes at local and systemic levels under experimental traumatic muscle injury and platelet-rich correction. plasma (PRP) and mesenchymal stem cells (MSCs) in the early and late post-traumatic periods, and studying the effect of PRP on the proliferative activity of fibroblasts, myogenic cells and mesenchymal stem cells of rat umbilical cord in vitro.

In the first stage of the study, a comparative study of the effect of PRP on the proliferative activity of fibroblasts, myogenic cells and MSC of rat umbilical cord in vitro.

The experimental study was performed on 132 nonlinear white rats weighing 180–210 g in compliance with the general rules and regulations on the protection of

vertebrates used for research and other scientific purposes under conditions of thiopental-sodium anesthesia (40 mg per 1 kg). The early and late post-traumatic periods were studied, so the animals were removed from the experiment on the 1-st, 7-th, 14-th, and 21-st days of the experiment.

Traumatic muscle injury was simulated in a group of experimental animals by applying a single dosed blow to the muscle with a specially designed device with a diameter of 1 cm² and an energy of 0.61 J.

In conditions of traumatic injury of the thigh muscles, hyperactivation of lipid peroxidation processes is observed as early as the 1st day, increasing to the 7th day of the post-traumatic period compared to animals without simulated pathology.

Under the condition of PRP and MSC correction, the activity of free radical processes was suppressed, which led to a decrease in the level of LPO products and an increase in the activity of enzymes of the antioxidant system and was accompanied by a decrease in oxidative myocyte damage.

The data obtained as a result of experimental research on the effects of traumatic muscle injury indicate that endotoxemia develops as a result, as evidenced by the accumulation of endotoxins in animals, as indicated by pronounced changes in endogenous intoxication – erythrocyte and leukocyte mass indices of intoxication. . The most pronounced changes in the content of both fractions of MSM were observed one day after injury and remained higher than intact until the 21-st day of the post-traumatic period.

The author focuses on the effectiveness of platelet-rich blood plasma in healing muscle damage, based on the presence of growth factors and cytokines that regulate the processes of repair and repair of various tissues, including regulation of cell migration and proliferation, angiogenesis, inflammation management and collagen synthesis.

The author uses MSC-s to correct traumatic muscle damage and evaluates their effectiveness, taking into account the fact that different types of stem and progenitor cells together affect muscle regeneration, directly by differentiating into muscle cells,

or the release of paracrine factors (factors of growth, cytokines), which control the regenerative response.

In traumatic muscle injury, serum proinflammatory cytokine levels in rats simulated muscle injury were significantly higher than in animals without simulated pathology: IL-1 β concentration on the 1st day after injury was significantly higher than in animals without simulated pathology 2.4 times; TNF- α is 2.6 times, and IL6 is 2.4 times, respectively. Analyzing the dynamics of changes in the concentration of proinflammatory cytokines, it should be noted their unidirectionality, in particular, maximum growth on the first day, slight decrease and fluctuations at almost the same level for 7-th to 14-th days and decrease to 21-st days.

Traumatic muscle injury increases the amount and activity of proteolysis enzymes, leading to a "protease explosion." Thus, lysis of azoalbumin on the first day after injury was significantly higher than that of animals without simulated pathology in 7.6 times, lysis of azocasein in this observation period was 10.3, and lysis of azocol – 7.7 times higher than in animals whose injuries were not simulated. One of the reasons for this transformation is a decrease in the activity of endogenous proteinase inhibitors and increased permeability of lysosomal membranes. However, one of the most important parts of proteolysis control is the content in blood and tissues of specific proteins and inhibitors of proteolytic enzymes, in particular α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulin, antithrombin III, α 2-antiplasmin, α 1-antichymotrypsin, which form complexes with reducing their activity in animals with mechanical trauma to the thigh muscles, there is an intense increase in proteolytic activity of the blood against the background of less pronounced increase in antiprotease activity, as well as an increase in the permeability of lysosomal membranes. This leads to a significant imbalance in the protease / antiprotease system and an increase in the proteolysis index.

The application of the corrective factor was found to be accompanied by a significant shift in the protease / protease inhibitor ratio towards a predominance of proteolysis inhibition processes, which may be essential to accelerate the regeneration of muscle tissue damaged by mechanical injury.

The induced changes cause the development of destructive and inflammatory changes throughout the body, which are confirmed histologically. The author points to histological and morphometric changes of muscles on the 1st day of the early post-traumatic period in the simulation of traumatic muscle damage in the area of injury, which consisted of acute circulatory disorders with focal destruction of blood vessels, destroyed muscles impregnated with erythrocytes, edema. fibers, tissue detritus, a small number of lympho- and histiocytes, mast cells, single segmental leukocytes and a significant amount of fibrin. Circulatory disorders increased in the lungs in combination with moderate lymphatic-plasmacytic infiltration of the stroma by the 14th day and decreased slightly by the 21st day. In the liver, the lobular structure was disturbed, pronounced dystrophic changes increased mainly by the 14th day, and the manifestations decreased slightly by the 21st day. In the kidneys, circulatory disorders increased in both the cortical and cerebral layers, there were dystrophic changes in the epithelium of the excretory tubules.

Morphometric analysis of muscle fibers on the 1-st day after traumatic muscle injury revealed that the area of damaged muscles exceeded the area of intact tissues. Histochemical examination of the lesion site showed that traumatic muscle injury was dominated by edema and tissue damage. Fragments of collagen fibers with signs of mucoid edema, a somewhat chaotic course of fibrils, among which erythrocytes, lymphocytes and leukocytes were determined, were observed in places around the muscles.

When using PRP on the 1-st day of observation, it was found in the area of damage to the dilation and plethora of blood vessels, an acute inflammatory reaction around the vascular wall, but significant perivascular edema of the stroma was not visualized. Necrotic changes were visualized in the damaged muscles. Morphometric analysis showed that the area of intact muscle was small and the number of damaged muscle fibers was predominant, but the rate was 10 % lower than in animals that were not corrected. Histochemical examination of the area of muscle damage on the background of PRP correction revealed that in the area of traumatic muscle injury, a

pronounced stroma edema was visualized, saturated with scanty fractions of collagen fibers, which were located mostly chaotically.

Better muscle fiber recovery in animals under PRP correction on days 14-th and 21-st of the experiment by reducing the number of damaged fibers, increasing the number of regenerating fibers, reducing the inflammatory response, edema, and collagen stroma compaction at the site of injury.

The use of MSCs has a more general protective effect on the structure of damaged mainly epithelial structures of parenchymal organs.

The use of MSCs in a model of traumatic muscle injury on the 1-st day in the area of injury was found mainly vascular plethora in combination with an acute inflammatory reaction around the vascular wall, in combination with perivascular edema. Necrotically altered myocytes were visualized. Morphometrically, the area of intact muscle was virtually indistinguishable from the PRP correction group, and the number of damaged muscle fibers was slightly higher.

Scientific novelty of the obtained results In the dissertation work the influence of PRP on the proliferative activity of fibroblasts, myogenic cells and mesenchymal stem cells of rat umbilical cord in vitro was studied for the first time. It was found that platelet-rich plasma has a pronounced mitogenic effect on mesenchymal cells, a significant anti-inflammatory effect. has a pronounced stimulating effect on the proliferative activity of fibroblasts, but less effective in the case of cell culture of mesenchymal stem cells.

It was found for the first time that under the conditions of experimental correction with the use of PRP there is an inhibition of lipid peroxidation and an increase in the activity of enzymes of the antioxidant system.

Muscle injury simulations were first demonstrated to be accompanied by an increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines IL-1 β TNF- α IL-6 with maximum growth on the first day, a steady increase during days 7-th-14-th, and a decrease to 21-st.days

Traumatic muscle injuries have been shown to cause endotoxemia, which is manifested by the accumulation of endotoxins in the body, as evidenced by

significant changes in endogenous intoxication: erythrocyte and leukocyte indices of intoxication and the content of medium weight molecules.

Animals with experimental traumatic thigh muscle injury were found to have an intense increase in blood proteolytic activity with less pronounced increase in antiprotease activity, as well as an increase in lysosomal membrane permeability, leading to a significant imbalance in the protease / antiprotease system and an increase in proteolysis index.

For the first time, a set of muscle disorders after injury was shown histologically and morphometrically, and the anti-inflammatory and regenerative effects of platelet-enriched plasma and mesenchymal stem cells were demonstrated.

In the simulation of traumatic muscle injury, it was found that on the 1st day of the experiment, the organs we studied developed dystrophic changes in all epithelial components, but they are most pronounced in the liver and lungs.

The use of PRP and MSC has a different degree of protective effect from the 1st day of use. The use of PRP has a predominantly local effect to correct the healing of traumatic muscle damage, improves the recovery of structures in the wound area and has a superficial effect on the recovery of the epithelial component of parenchymal organs, mainly in the long term.

The practical significance of the results. The results of the research supplement and clarify the scientific data on the pathogenetic features of systemic and local disorders in traumatic muscle injury. Intensification of lipid peroxidation processes, development of endotoxemia, imbalance in the system of proteases / antiproteases, increase in serum proinflammatory cytokines are key factors that determine the severity of systemic disorders. The author's demonstration of a positive effect on repair processes, reduction of the severity of inflammation and reduction of systemic manifestations of damage to platelet-rich plasma and stem cells is a theoretical basis for the use of these drugs in the clinic, which requires further preclinical study.

In the simulation of traumatic muscle injury, it was found that on the 1st day of the experiment, the organs we studied developed dystrophic changes in all epithelial components, but they are most pronounced in the liver and lungs.

The use of PRP and MSC has a different degree of protective effect from the 1-st day of use. The use of PRP has a predominantly local effect to correct the healing of traumatic muscle damage, improves the recovery of structures in the wound area and has a superficial effect on the recovery of the epithelial component of parenchymal organs, mainly in the long term.

The obtained results are implemented in the practice of scientific research and educational process at the departments of pathological physiology, medical biochemistry, and physiology with the basics of biosafety, military medicine and disaster medicine of I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine.

Key words: traumatic injury, muscle, platelet-rich blood plasma, mesenchymal stem cells, experiment, oxidative stress, cytokines, proteinases / proteinase inhibitors, endogenous intoxication.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, скорочень і термінів	21
Вступ	22
Розділ 1 Сучасні уявлення про патогенетичні механізми м'язової травми та методи їх корекції (огляд літератури)	29
1.1 Динаміка перебігу травми м'язової тканини	29
1.2 Механізм відновлення м'язової тканини у посттравматичному періоді	32
1.3 Експериментальне обґрунтування використання PRP в процесах репаративної регенерації м'язової тканини	42
1.4 Експериментальне обґрунтування використання мезенхімальних стовбурових клітин в процесах репаративної регенерації м'язової тканини	46
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	50
2.1 Групи тварин для дослідження та експериментальна модель	50
2.2 Методи дослідження	54
2.2.1 Методи дослідження процесів ліпопероксидації та стану антиоксидантного захисту	54
2.2.2 Визначення показників ендогенної інтоксикації	55
2.2.3 Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ	56
2.2.4 Визначення вмісту цитокінів сироватки крові	57
2.3 Методика отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин	57
2.4 Обґрунтування в експерименті <i>in vitro</i> впливу PRP на процеси регенерації	59
2.5 Методи морфологічного дослідження	61
2.6 Статистичні методи дослідження	62

Розділ 3 Вивчення в експерименті <i>in vitro</i> впливу збагаченої тромбоцитами плазми крові на процеси регенерації	63
Розділ 4 Структурні зміни м'язів ділянки пошкодження, легенів, печінки, нирок при моделюванні травматичного ушкодження м'язів та його корекції збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальними стовбуровими клітинами у ранньому та пізньому посттравматичному періодах	70
4.1 Гістологічні та морфометричні зміни м'язів у ранньому посттравматичному періоді та за корекції збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальними стовбуровими клітинами	70
4.2 Гістологічні та морфометричні зміни м'язів у пізньому посттравматичному періоді та за корекції збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальними стовбуровими клітинами	81
4.3 Динаміка структурних морфологічні зміни нирок, печінки та легень у тварин з травматичним ушкодження м'язів та проведенні корекції збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальними стовбуровими клітинами	90
Розділ 5 Особливості окиснювальних процесів, системи протеїнази/інгібітори протеїназ і показників ендогенної інтоксикації у тварин з травматичним ушкодженням м'язової тканини та за дії коригуючих чинників	119
5.1 Особливості процесів ліпідної пероксидації у тварин з травматичним ушкодженням м'язів та проведенні корекції	119
5.2 Зміни показників ендогенної інтоксикації у тварин з травматичним ушкодженням м'язів та проведенні корекції	129
5.3 Особливості цитокінового профілю у сироватці крові щурів з травматичним ушкодженням м'язів та після проведення корекції	138

5.4 Зміни стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ при травматичному ушкодженні м'язів та після проведення корекції	149
Розділ 6 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	159
Висновки	182
Список використаних джерел	185
Додатки	217

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

КТ – каталаза

СОД – супероксиддисмутаза

МСМ – молекули середньої маси

PRP – збагачена тромбоцитами плазма крові

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

СЕІ – синдром ендогенної інтоксикації

ЛШ – лейкоцитарний індекс

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

АОС – антиоксидантний захист

МДА – малоновий діальдегід

ДК – диєнові кон'юганти

TNF- α – тумор некротичний фактор

TNF α – фактор некрозу пухлини α

INF α – інтерферон α

IL6 – інтерлейкін 6

IGF-1 – фактор росту 1 інсуліну

VEGF – фактор росту судинного ендотелію

HGF – фактор росту гепатоцитів

PDGF-BB – фактор росту тромбоцитів

FGF – фактор росту фібробластів

ВСТУП

Актуальність теми. Проблема травматизму залишається надзвичайно актуальною і має не тільки медичне але й соціальне значення. Зростання травматизму в усьому світі залишається однією з актуальних соціально-економічних проблем сучасності [1, 24, 25, 46, 112, 143, 169, 170, 200]. В Україні щороку травми різного ступеню тяжкості отримує близько 10 % населення.

Щодня від травм в Європейських країнах гине понад 2000 людей, близько 60 тисяч потрапляють до лікарень та 600 тисяч потребують невідкладної допомоги [1, 24, 26, 32, 42, 46, 170, 200]. За даними ВООЗ втрати людства через смертність від травматизму складають 424 000 людей щорічно [290]. Згідно міжнародного дослідження найбільшою загрозою для мешканців Європейського регіону, в тому числі й для України, є травматизм [170, 282, 290].

За даними ВООЗ, серед причин смертності травми посідають третє, а серед населення до 40 років – перше місце [290]. Незважаючи на те, що потерпілі з політравмою складають 8-10 % від усіх, що поступають на стаціонарне лікування, саме на них приходить до 68 % летальних випадків [1, 31, 32]. При цьому смертність від нещасних випадків і травм постійно зростає – в середньому на 1 % щорічно, що є свідченням недостатньої ефективності надання медичної допомоги таким хворим [1, 25, 26, 31, 32, 42, 43].

Травми м'яких тканин становлять понад 50 % усіх травм опорно-рухового апарату [8]. Травми скелетних м'язів – найпоширеніша травма, пов'язана зі спортом, і головна проблема в спортивній медицині [39, 43, 45, 51, 77, 84, 108, 110, 191]. Травма взагалі, а механічна зокрема є провідною причиною насильницької смерті, і серед структури, механічна травма займає третє місце після серцево-судинної патології та онкопатології [1, 26, 31, 32, 290].

Травматичне ушкодження м'язів залишається актуальною проблемою на сьогоднішній день та є однією з найчастіших постраждалих осіб працездатного віку. Проте травматизм – це не тільки проблема охорони здоров'я, це ще й соціальна проблема. При травмі потрібно довготривале лікування, яке викликає втрату працездатності та інвалідності, які зумовлені травмами кінцівок [25, 42].

Слід зазначити, що травми м'язів також одна з найпоширеніших травм, що виникають у спорті [43, 45, 51, 77, 84, 108, 110, 191]. Незважаючи на їх клінічне значення, існує лише кілька клінічних досліджень щодо лікування м'язових травм.

Згідно літературних даних проблема патогенезу травматичного ушкодження м'язів залишається актуальною. Роль в патогенезі оксидативного стресу, ендогенної інтоксикації, протеїназ/інгібіторів протеїназ, цитокінів потребує подальшого вивчення. Актуальною залишається проблема біології регенерації м'язів та пошук нових підходів до оптимального лікування травм скелетних м'язів [13, 14, 29, 30, 91, 93, 104, 141, 153, 234, 236, 295].

Використання PRP при травматичному ушкодженні м'язів може розглядатися як метод лікування трав м'язових тканин. Проведені дослідження використання PRP при лікуванні остеоартрозу показали позитивний ефект від даного методу лікування. Однак вплив PRP на м'язову тканину та морфологічні зміни за умов травматичного ушкодження м'язів потребують додаткового вивчення та деталізації.

Згідно літературних даних збагачена тромбоцитами плазма крові досить широко використовується для прискорення репарації м'язів, сухожилля після травм та при ускладненнях (хронічних виразок, тендинопатій); у стоматології та хірургії щелепно-лицьової ділянки; пластичній хірургії і корекційній косметології [8, 9, 34, 48, 65, 105, 108, 109, 110, 236].

Регенеративний потенціал скелетних м'язів покладається насамперед на клітини-супутники (СК), прототипові стовбурові клітини м'язів. Після травми м'язів СК входять у клітинний цикл, розмножуються та диференціюються, щоб

відновлювати пошкоджені міоволокна, одночасно відновлюючись для збереження резерву [220].

Тому важливим і обґрунтованим є оцінка ролі в регенераторних процесах PRP *in vitro* та застосування методів корекції, за допомогою яких можна регулювати проліферативні процеси в ураженому м'язі та порушення на місцевому та системному рівнях [100, 250, 262].

Таким чином, на сучасному етапі вивчення ефектів збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів є перспективним науковим напрямком для доклінічного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних міжкафедральних науково дослідних робіт Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України «Системні та органні порушення за дії надзвичайних факторів на організм, механізми їх розвитку та патогенетична корекція» (№ держреєстрації 0116U003390) та «Дослідження регенераторного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при пошкодженні тканин в експерименті та перспективи їх терапевтичного застосування» (№ держреєстрації: 0120U104146), де дисертант є співвиконавцем.

Мета дослідження: з'ясувати особливості патологічних змін у м'язовій тканині та організмі щурів при травматичному ушкодженні м'язів та обґрунтувати доцільність використання збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для їх корекції.

Завдання дослідження:

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі:

1. Дослідити активність процесів вільнорадикального окиснення та стан антиоксидантного захисту у тварин з травматичним ушкодженням м'язів нижніх кінцівок в ранній та пізній посттравматичні періоди.

2. Встановити особливості функціонування системи протеїнази/інгібітори протеїназ за умов травматичного ушкодження м'язів нижніх кінцівок та його корекції.

3. Дослідити особливості цитокінового профілю сироватки крові тварин з травматичним ушкодженням м'язів нижніх кінцівок та за умов корекції.

4. З'ясувати динаміку показників ендогенної інтоксикації у щурів з травматичним ушкодженням м'язів та за умов корекції.

5. З'ясувати вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на проліферативну активність фібробластів, міогенних клітин та мезенхімальних стовбурових клітин пуповини щурів в умовах *in vitro*. Оцінити вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на регенеративні процеси в м'язовій тканині *in vitro*.

6. Дослідити особливості структурно-функціональної організації м'язової тканини на тлі травматичного ушкодження м'язів нижніх кінцівок і за корекції з використанням PRP та стовбурових клітин.

7. Дослідити особливості структурно-функціональної організації легень, нирок та печінки на тлі травматичного ушкодження м'язів нижніх кінцівок і за корекції з використанням PRP та стовбурових клітин.

Об'єкт дослідження: вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг травматичного ушкодження м'язів.

Предмет дослідження: особливості процесів ліпідної пероксидації, системи антиоксидантного захисту, цитокінового профілю, ендогенної інтоксикації та функціонування системи протеїнази/інгібітори протеїназ, патоморфологічні зміни в тканині м'язів, легень, печінки, нирки при травматичному ушкодженні м'язів та корекції з використанням збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин.

Методи дослідження: експериментальні – для моделювання травматичного ушкодження м'язів, морфологічні: морфометричні та гістохімічні – для вивчення закономірностей структурної організації м'язів,

печінки, нирки, легень при травматичному ушкодженні м'язів, та при корекції збагаченою тромбоцитами плазмою та мезенхімальними стовбуровими клітинами; визначення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ, показників ендогенної інтоксикації, методи дослідження процесів ліпопероксидації та стану антиоксидантного захисту, визначення стану цитокінів; гістологічні: фарбування препаратів гематоксилін-еозином, за Ван-Гізеном; статистичні – для обробки отриманих результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено аналіз інтегральних показників ендотоксемії, особливостей біохімічних, імунокорективних, метаболічних змін при експериментальному травматичному ушкодженні м'язів.

Вперше проведено моделювання впливу збагаченої тромбоцитами плазми крові на проліферативну активність фібробластів, міогенних клітин та мезенхімальних стовбурових клітин пуповини щурів в умовах *in vitro*. Встановлено, що багата тромбоцитами плазма має виражений мітогенний вплив на мезенхімальні клітини, значний протизапальний ефект.

Виявлено виражені метаболічні зміни, дисбаланс адаптаційно-компенсаторних механізмів, спрямованих на ліквідацію патологічних чинників, спричинених травмою м'язів.

Вперше отримано результати порівняльного аналізу морфологічних та біохімічних змін при травматичному ушкодженні м'язів за умов експериментальної корекції з використанням збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальних стовбурових клітин.

Встановлено, що за умов експериментальної корекції з використанням PRP відбувається пригнічення активності вільнорадикальних процесів та зростання активності ферментів антиоксидантної системи, зростає активність ферментів протеолізу, протеолітична активність крові, зростання проникності лізосомальних мембран, що призводить до значного дисбалансу у системі протеази/антипротеази, зниження показників прозапальних цитокінів сироватки крові у щурів.

З використанням морфометричного аналізу встановлено, що при застосуванні коригуючих чинників (МСК та PRP) зростає відсоток неушкоджених волокон в ділянці травми та збільшується кількість регенеруючих волокон.

Доведено, що застосування PRP для корекції загоєння травматичного ушкодження м'язів проявляє переважно місцевий ефект, покращує відновлення структур в ділянці рани та має поверхневий вплив на відновлення епітеліального компонента паренхіматозних органах, переважно у віддалені періоди. Застосування МСК проявляє більш загальний протекторний вплив на структуру пошкоджених переважно епітеліальних структур паренхіматозних органів.

Практичне значення отриманих результатів Результати досліджень доповнюють та уточнюють наукові дані про травматичне ушкодження м'язів та вплив корекції збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин на репаративні процеси при травмі. Впроваджено в практику наукових досліджень та навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології, медичної біохімії, фізіології з основами біобезпеки, військової медицини та медицини катастроф Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського та на кафедрах медицини катастроф та військової медицини, патологічної фізіології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» МОЗ України.

Особистий внесок здобувача Автором проведено інформаційно-патентний пошук, аналіз вітчизняної та іноземної літератури з досліджуваного питання, самостійно проведено моделювання травматичного ушкодження м'язів та проведена методика центрифугування, статистична обробка досліджень, моделювання впливу збагаченої тромбоцитами плазми крові на проліферативну активність фібробластів, міогенних клітин та мезенхімальних стовбурових клітин пуповини щурів в умовах *in vitro*, сформульовано основні наукові положення дисертації, написано й оформлено дисертаційну роботу.

Висновки сформульовано разом з керівником. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, викладено фактичний матеріал дисертації.

Апробація результатів дослідження. Основні положення дисертації оприлюднені на LXI, LXIII, LXIII науково-практичних конференціях «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2018, 2019, 2020 р.); XXIII міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2019 р.); Першому галицький хірургічний форум «Інноваційні технології в хірургії» (Тернопіль, 2020 р.); XXIV міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2020 р.) ; VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів (Тернопіль, 2020 р.); XII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2020 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць, з них 5 статей у наукових фахових виданнях України, 2 – в періодичному виданні іншої держави, що входить до Організації економічного співробітництва та розвитку і Європейського Союзу, 8 публікацій в матеріалах міжнародних конгресів та конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 226 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3-ьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, який включає 299 бібліографічних описів, додатків. Робота ілюстрована 18 таблицями та 78 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 42 сторінках.

РОЗДІЛ I

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ М'ЯЗОВОЇ ТРАВМИ ТА МЕТОДИ ЇЇ КОРЕКЦІЇ (огляд літератури)

1.1 Динаміка перебігу м'язової травми

Скелетна мускулатура складається з великої та неоднорідної кількості клітинних популяцій, які взаємодіють між собою для підтримки м'язового гомеостазу та процесів регенерації та побудована з двох основних компонентів, мі фібри та сполучної тканини. Мі фібри з нервовою іннервацією відповідають за скоротливу функцію м'язу, тоді як сполучна тканина забезпечує основу, яка зв'язує окремі м'язові клітини разом під час скорочення м'язів і охоплює капіляри та нерви в структурі м'язів. Скелетна мускулатура мі волокна – це стрічкоподібні клітини з різною довжиною від кількох міліметрів до 50 см., та різним діаметром.

Травматизм є актуальною проблемою сьогодення. Понад 50 % усіх травм порно-рухового апарату складають травми м'язових тканин [63, 73, 75, 84, 121, 133, 149, 290, 293, 297].

Травми класифікують за локалізацією, механізмом перебігу та тяжкістю перебігу. Причини травм можуть бути внутрішніми або зовнішніми. Анатомічно встановлено, що м'язи можуть розриватись як біля сухожилів, так безпосередньо в тілі м'яза [156, 159, 166, 173, 181, 191]. М'язові травми поділяють на три групи: контузія, розтягнення, розрив м'язової тканини. За літературними даними до 90 % всіх м'язових травм в спортивній медицині складають контузії та розтягнення, а 10 % припадає на розриви м'язової тканини [59, 68, 133, 149, 166, 190]. М'язова контузія є найбільш поширеним типом травми яка виникає при швидкому та сильному зовнішньому ударі в ділянку м'язу, без розриву поверхневих тканин, та призводить до утворення гематоми. Симптоми такого пошкодження є больове відчуття, набряк,

обмежена рухливість [10, 21, 214, 215, 226, 227, 231, 247]. Розтягнення – це деформація м'яза, яка виникає у міотендному з'єднанні, де концентрується найбільше напруження, яке передається на весь скелетний м'яз. Пошкодження поширюється на десятки міофібрил та сухожилльне з'єднання з кісткою [126, 127, 247]. Розтягнення м'яза виникає тоді, коли відбувається ексцентричне його скорочення при одночасній дії протплежних сил. Мультисулобові м'язи найбільш схильні до розтягнення, оскільки, на них впливають внутрішні сили, м'язи швидко змінюють довжину і відповідно режими скорочення. Мультисуглобові м'язи побудовані переважно з волокон II типу, метаболізм яких впливає на функціональні характеристики м'язів, схильних до ризику виникнення механічної травми. Мязове розтягнення клінічно характеризується надривом м'язового волокна, крововиливами та набряком. Розрізняють три ступені тяжкості мязового розтягнення: легка (перший ступінь) – травмовані лише декілька м'язових волокон з мінімальною втратою структури міофібрил, клінічно лише незначний набряк та дискомфорт, з незначною втратою сили скорочення та обмеження руху; помірна (другий ступінь) – має місце травматизація міофібри, яка полягає у частковому надриві, клінічно – біль з втратою сили скорочень в подальшому; важка (третій ступінь) – відбуваються надриви м'язу, клінічно – травмований м'яз повністю втрачає мязову функцію. Патогенез м'язової травми полягає в розриві оболонки м'язового волокна, з руйнуванням мембрани, вихід позаклітинного кальцію та р а далі проникнення позаклітинного кальцію у м'язову клітину, що призводить до ушкодження мязевих структур, розвиток апоптозу та запального процесу [21, 153, 154, 281].

Розрив м'язової тканини відбувається внаслідок ушкодження гострими предметами або сильним ударом і це приводить до деструкції тканини в місці ураження або втрачення частини тканини м'язу. Патолофізіологічні наслідки розривів пов'язані з запаленням. Згідно даних літератури при розриві повністю руйнується м'язова тканина з мембранами, нервами, тому її відновлення триває довше [5, 281].

Патогенез при травматичному ураженні м'язів складається з наступних фаз:

– руйнування, яке виникає внаслідок травми супроводжується некрозом міоволокна, утворення гематоми між розірваним м'язом та запальною клітинною реакцією;

– відновлення, яка складається з фагоцитозу некротизованої тканини, регенерації міофібри та утворення сполучнотканинного рубця, а також розпочинається м'язова васкуляризація та ангіогенез;

– ре моделювання – період, протягом якого дозрівають регенеровані міоволокна, скорочується та перебудується рубцева тканина та відновлюється функціональна здатність м'язу.

Останні 2 фази – відновлення та ремоделювання – взаємопов'язані [211, 230, 252, 253].

В літературі є описання та порівняння основних експериментальних моделей, які відтворюють механічні пошкодження м'язів. Розроблені моделі для відтворення м'язової травми дозволяють вивчити механізми перебігу контузії м'язів та процесів регенерації, а також тестувати можливі методи терапії в експерименті на тваринах [121, 255]. Існує декілька способів відтворення кожного виду механічної травми, проте необхідно враховувати специфічні характеристики при виборі моделі для експерименту [255]. В експерименті моделі ушкодження скелетного м'язу проводять двома способами – краш-модель різних м'язів та модель ушкодження тупого непроникаючого удару різних м'язів [179, 255]. За даними літератури найчастіше експериментальне дослідження проводиться за моделлю тупого непроникаючого удару [16, 179, 255]. За протоколом стандартної моделі контузія м'язу викликається ударом важкої кулі, які можуть бути різної маси, форми та з різних матеріалів, по досліджуваному м'язу задніх кінцівок тварин [94].

При розриві в ділянці травми м'язової тканини між міофібрами утворюється проміжок та травмована м'язова тканина піддається некрозу в межах розриву.

За літературними даними експериментальні моделі м'язового розтягнення у тварин ґрунтуються на використанні електричної стимуляції м'язу через шкіру накладанням електродів на певну ділянку, або через іннервуючий м'яз нерв для відтворення ексцентричного скорочення з наступними розтягненням та фіксацією [40]. В іншому випадку використовують розтягнення сухожиль для формування травми шляхом хірургічного втручання [15, 41, 44].

Пошкоджуючий вплив на м'язи призводить до розриву або контузії, часто супроводжується внутрішньом'язовим інтерстиціальним крововиливом і гематомою [211]. Реакція на травму м'язів може призвести до регенерації, дегенерації фіброзом і заміною жиру, або порушення проліферації тканин.

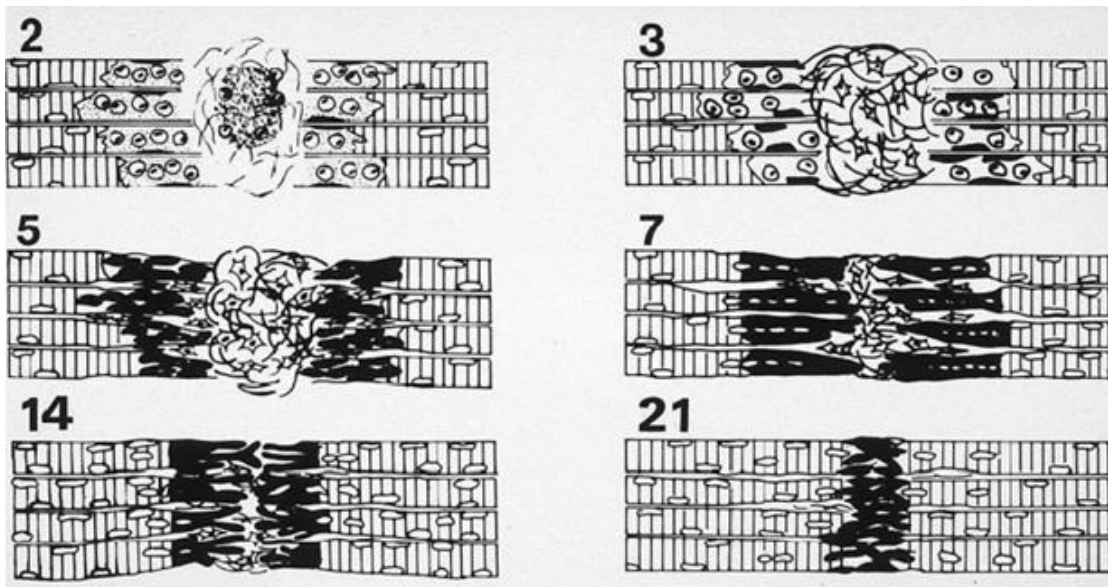


Рисунок 1.1 – Схематична ілюстрація загоєння скелетних м'язів
за Т.А. Jarvinen [247]

1.2 Механізм відновлення м'язової тканини в постравматичному періоді

Скелетний м'яз характеризується високим рівнем диференціації структурно-функціональних одиниць і насамперед самих м'язових волокон, регенерація яких може відбуватись в основному на клітинному рівні. Травматичне ушкодження та порушення регуляції тканинного обміну

призводить до атрофії та заміщення сполучною і жировою тканинами. Водночас навколо високодиференційованих м'язових волокон локалізуються клітини-сателіти, здатні забезпечувати відновний процес, ефективність якого визначається низкою факторів (порушення метаболізму, ішемія) [22, 213, 247]. Травма скелетних м'язів призводить до асептичної мікротравми м'язів та вираженого запального каскаду, що характеризується іммобілізацією лейкоцитів, інфільтрацією макрофагів, виробленням цитокінів та підвищеним окислювальним стресом та характеризується підвищеним протеолізом [10, 21, 163, 199, 203, 285].

Відновлення пошкодженої м'язової тканини відбувається у основних напрямках. Реституція характеризується відновленням пошкоджених ділянок з клітинами, внутрішньоклітинними структурами, які перебували в стані парабіозу та анабіозу через дію екзогенного чинника. Даний процес має місце з моменту припинення дії ушкоджувального фактору. При регенерації відновлення ушкоджених тканин відбувається шляхом клітинного поділу неуражених ділянок ткани та органів. Регенерації ґрунтується на фізіологічному безперервному оновленні клітин, який при патології змінюється кількісно [252].

Регенерація скелетних м'язів відбувається за трьома різними фазами, які нашаровуються одна на одну (рис. 1.1).

1. Перша фаза – руйнування, переродження після важкої травми характеризується некрозом, утворення гематоми у травмованому м'язі та запальною клітинною реакцією;

2. Фаза відновлення, що складається з фагоцитозу некротизованої тканини, регенерації міофібри та утворення сполучнотканинного рубця, капіляри вростають в травмовану ділянку;

3. Фаза ремоделювання – період, протягом якого дозрівають регенеровані міоволокна, скорочується та перебудується рубцева тканина та відновлюється функціональна здатність м'язу.

Останні 2 фази – відновлення та ремоделювання – зазвичай тісно пов'язані або перекриваються [92, 156, 233, 234, 235, 247, 264].

При травматичному ураженні міофібра, що розірвалася, некротизується лише на невеликій відстані та обмежується смугою стиснення, що утворюється протягом декількох годин. Гематома спочатку заповнює проміжок з подальшим утворенням фібропластичного рубця [92]. Починається регенерація міофібри активація резервних супутникових осередків протягом години після травми.

М'язова травма супроводжується розвитком у тканині запального процесу [179, 213 59, 87, 187]. При механічній травмі, в м'язовій тканині виникає запальна реакція у відповідь на пов'язані з пошкодженням молекулярні структури та асоційовані з патогеном молекулярні структури, що виділяються відповідно мертвими та відмираючими клітинами. Отже, гострий запальний процес при травмі є фізіологічним процесом, що забезпечує не тільки звільнення вогнища від часточок пошкодженої тканини, але сприяє в подальшому регенерації м'язу [213, 217].

За фізіологічних умов активність протеолітичних ферментів урівноважена із рівнем інгібіторів протеїназ. При критичних станах відбувається порушення динамічної рівноваги між протеазами та їх інгібіторами. Збільшення кількості та активності ферментів протеолізу тканинного походження веде до «протеазного вибуху», у зв'язку з чим гіперактивуються згортальна, фібринолітична, калікреїн-кінінова, ренін-ангіотензин-альдостеронова системи і комплемент. Викликані зміни зумовлюють розвиток деструктивних і запальних змін у всьому організмі [38, 52].

За дії різних патогенних чинників спостерігається значне підвищення активності протеолітичних ферментів, і вони з фактора регуляції перетворюються на чинник пошкодження. Однією з причин, які зумовлюють цю трансформацію, є зниження активності ендогенних інгібіторів протеїназ і підвищення проникності лізосомальних мембран.

Патогенез запалення у скелетному м'язі схожий до процесів запальної реакції у інших тканинах та органах, при яких нейтрофіли та макрофагами мігрують в ділянку травми [179, 180, 213, 295, 296]. При травмуванні м'язу відмічається пошкодження структури м'язових волокон, капілярів та малих судин. Як наслідок має місце контакт, ендотеліоцитів, тромбоцитів гладком'язових клітин судинної стінки з структурами позаклітинного матриксу та секреція клітинами протизапальних медіаторів: Е-селектину, простагландинів, TGF β , MCP1, інтерлейкінів IL-1 та IL-8, [134, 148, 155, 158, 281, 282, 283, 284, 285]. Ключову роль у регуляції запалення м'яза відіграють фагоцитуючі клітини: нейтрофіли, моноцити, резидентні макрофаги [282, 283]. Перехід нейтрофілів до пошкодженого м'язу спостерігається через 60-90 хвилин після травми. Максимум активності нейтрофілів – 24 годин після травми [196, 215] і не виявляються через 3 дні [284]. Їх дія на некротичну тканину – це протеоліз, окислення та фагоцитоз [55]. М'язоспецифічне гальмування активації нейтрофілів / моноцитів призводить до затримки регенерації при гострій травмі [217, 247].

Важливим фактором активності нейтрофілів є вироблення активних форм кисню та розвиток ПОЛ в ділянці запалення, що веде до подальшого пошкодження м'язів. ПОЛ також є важливим фактором регуляції запалення. Отже первинне пошкодження – це безпосередньо травма та вторинне пошкодження внаслідок активації перекисного окислення ліпідів в тканині [16, 34, 140, 196, 242, 258, 276, 277]. Результатом активності нейтрофілів та системи мононуклеарних фагоцитів є звільнення вогнища запалення від фрагментів пошкодження клітин та білків позаклітинного матриксу, що є необхідною умовою для наступної регенерації тканин [179, 286]. Особливістю м'язового запалення є здатність м'язових волокон секретувати медіатори запалення: IL-1 та IL-8, MCP1, TNF- α , IL6, IL1, HIF-1 β , GM-CSF [56, 96, 119, 142, 176, 177, 178, 183, 226, 259]. Ці медіатори є хемотактичними агентами для моноцитів, нейтрофілів та інших імунокомпетентних клітин. У відповідь на їх секрецію відбувається міграція лейкоцитів до пошкодженої ділянки м'язів та розвиток

запалення [179, 196, 203, 205, 285, 292]. Цитокін ІІ-6 виділяється макрофагами, моноцитами, фібробластами, ендотеліоцитами, нейтрофілами та корегує регуляцію та координацію імунної відповіді. Цитокін ІІ-6 є міокіном який відповідає безпосередньо за запалення та виділяється м'язовими волокнами при фізіологічній м'язовій активності та при травматичному ушкодженні. Отже цитокін ІІ6 проявляє прозапальну та протизапальну дію, яка залежить від фази запалення. Цитокін ІІ-6 на початкових етапах впливає на розвиток запалення та відповідно вторинного ушкодження тканин, на завершальних етапах – його роль у регуляції процесів регенерації. За літературними даними макрофаги відіграють вирішальну роль на початкових стадіях після пошкодження тканин, оскільки вони необхідні для фагоцитозу та вивільнення цитокінів [56, 109, 199].

Макрофаги в перші 3 дні сприяють проліферації міобластів через секрецію прозапальних молекул, таких як TNF α , INF α або ІІ6 [146]. Потім макрофаги зазнають фенотипічного та функціонального переходу до протизапальної дії, що характеризується виробленням ІІ4 або ІІ10 [108, 118, 135, 197, 226]. Ця протизапальна реакція стимулює FAPs, мезоангіобласти, а також безпосередньо міобласти, щоб сприяти диференціації та зрощенню [128]. Важливо, що макрофаги-резиденти м'язів також беруть участь у імунній відповіді після травми [109]. Також є дані, що макрофаги здатні сприяти пошкодженню м'язів *in vivo* та *in vitro* шляхом вивільнення вільних радикалів, хоча інші результати свідчать про те, що вони також можуть грати роль у відновленні та регенерації м'язів за допомогою факторів росту та опосередковано цитокінами [183, 201, 282].

Дані останніх наукових досліджень вказують на роль макрофагів в збереженні гомеостазу та відновленні пошкодженої тканини [94, 199, 291]. У відповідь на екологічні чинники вони демонструють прозапальний (M1) або альтернативний протизапальний (M2) фенотип. Після гострої травми макрофаги M1 рано проникають, щоб сприяти некротичним змінам, тоді як M2 макрофаги з'являються пізніше для підтримки загоєння тканин. Порушення функцій макрофагів та/або активація може призвести до порушення регенерації та

відкладення фіброзу [282]. Гетерогенність і пластичність є характерними ознаками макрофагів. Отже, актуальною є роль різних фенотипів макрофагів після травми та під час фази ремоделювання у скелетних м'язах. Активація та міграція клітин-сателітів та відновлення м'язевих волокон відбувається при нормальній активності мононуклеарних фагоцитів. Активація Т-клітин лімфоцитами та секреція IL-4 сприяє прискореному росту тканини м'язу [96, 199, 284].

М'язова васкуляризація та ангіогенез забезпечують структурну, клітинну та молекулярну підтримку під час гомеостазу, регенерації та адаптації. Кількість стовбурових клітин м'язів (MuSCs) і капілярів, а також терміни ангіогенезу та міогенезу під час регенерації, взаємопов'язані. Експериментальні дані свідчать, що ендотеліальні клітини стимулюють ріст супутникових клітин за рахунок секреції різноманітних факторів росту, включаючи IGF-1, VEGF, HGF, PDGF-BB та FGF [130, 146, 167, 216, 245, 291].

Згідно даних останніх досліджень виявлено взаємодію між скелетними м'язами та запальними клітинами, яка вказує, що запальні клітини сприяють як пошкодженню, так і відновленню м'язової тканини завдяки комбінованій дії вільних радикалів, факторів росту та хемокінів [96, 219, 262, 283]. Нові дані чітко показують роль нейтрофілів у сприянні пошкодження м'язів відразу після травми м'язів. Протягом 5–6 днів некротизована частина травмованого міоволокна всередині залишку старої базальної пластини замінюється відновлювальним міоволокном, яке потім починає проникати в сполучнотканинний рубець між куксами розірваних міоволокон. Ділянка пошкодження також реваскуляризується через три дні після пошкодження шляхом вrostання капілярів з першими ангіогенними капілярними паростками.

Регенеративний потенціал скелетних м'язів покладається насамперед на клітини-супутники (СК), прототипові стовбурові клітини м'язів. Після травми м'язів СК входять у клітинний цикл, розмножуються та диференціюються, щоб відновлювати пошкоджені міоволокна, одночасно відновлюючись для збереження резерву [49, 182, 218, 220, 221, 242]. Гостре пошкодження скелетних м'язів призводить до запалення та вироблення реактивних видів, що

може спричинити активацію СК [179]. Захист цих клітин від окисних пошкоджень є важливим для забезпечення достатньої регенерації м'язів [276]. Антиоксидантні резерви СК захищають ці клітини від окислювальних пошкоджень, тоді як антиоксидантні ферменти, глутатіонпероксидаза, СОД та тіоредоксин регулюють гомеостатичне програмування спокійних СК.

М'язові супутникові клітини мають вирішальне значення для регенерації м'язів після травми м'язів. Після активації СК генерують міобласти, які диференціюються, або самостійно відновлюються під час симетричного або асиметричного поділу клітин [98]. Після травми м'язів СК входять у клітинний цикл, розмножуються та диференціюються, щоб відновлювати пошкоджені міоволокна, одночасно відновлюючись для збереження резерву [182, 218, 220, 221, 242, 268]. Міогенні резервні клітини, супутникові клітини, активуються і починають відновлення порушеного міоволокна. Клітини-сателіти починають диференціюватися в міобласти, недиференційовані стовбурові клітини-супутники починають розмножуватися протягом 24 годин, та сприяють утворенню міобластів, одночасно забезпечуючи нові супутникові клітини асиметричним поділом клітин для майбутніх потреб регенерації. Протягом декількох днів міобласти, що утворюються із клітин-супутників та стовбурових клітин зливаються, утворюючи міотрубки [103, 114, 156, 169].

Фаза ремоделювання – це період дозрівання регенеруючих міоволокон, що включає формування зрілого скорочувального апарату та прикріплення кінців регенованих міоволокна до проміжного рубця за допомогою новоутворених МТJ, але відокремлені тонким шаром сполучної тканини. Скорочення великої грануляції до рубцевої тканини зумовлене фібробластами, що трансформуються до здатних до скорочення міофібробластів. Після очищення зруйнованих клітин, нові волокна формуються за рахунок транзиторно ембріонального та неонатального міозину важкого ланцюга від 3-ьох до 14-ти днів після травми. Фаза ремоделювання характеризується гіперплазією та гіпертрофією. На заключних етапах ремоделювання м'язів відновлюються васкуляризація та іннервація [156].

Після легкої або важкої травми м'язів стовбурові клітини м'язів активізуються, диференціюються та з'єднуються для відновлення пошкодженої ділянки. Легка травма індукує розрив волокна та набір навколишніх супутникових клітин на неушкодженій частині волокна. Навпаки, сильна травма запускає повне руйнування міофібри з подальшим розмноженням та диференціацією супутникових клітин на залишках позаклітинного матриксу [156].

Травми активізують регульований міогенний процес, включаючи взаємодію ключових факторів транскрипції. Під час гомеостазу, супутникові клітини спокою експресують Pax7 (і Pax3 в деяких м'язах) і Myf5, а Notch сигнали є дуже активними. Після пошкодження вони швидко регулюють MyoD та Myf5, а протеїн Pax7 залишається виявленим. Після фази ампліфікації міобласти експресують ген міогеніну кінцевої диференціації та виходять з клітинного циклу. Диференційовані міобласти зливаються з уже існуючими волокнами (легкі) або разом утворюються нові волокна (важкі). Під час цього процесу деякі супутникові клітини самостійно оновлюються, щоб поповнити пул стовбурових клітин. Хоча генерація нових волокон залежить від СК, інші типи клітин, такі як макрофаги, моноцити, мезенхімальні стромальні клітини (включаючи FAP, мезоангіобласти та PIS), перицитити, фібробласти також є важливими для процесу регенерації) [99, 105, 138, 224]. Хоча супутникові клітини (СК) – це стовбурові клітини м'язів – сприяють функціональному відновленню м'язів після пошкодження, деякі інші клітини, такі як клітини запалення, судин та мезенхіми, координують регенерацію м'язів у тонко налаштованому процесі. Фібро-адипогенні попередники (FAPs) – це м'язова інтерстиціальна мезенхімальна клітинна популяція, яка підтримує диференціювання СК під час регенерації тканин. Viferali Beatrice і співавтори [157] вивчали фактори, що регулюють діяльність FAP, підкресливши їх роль у міжклітинних взаємодіях між FAP та іншими популяціями клітин, які беруть участь у регенерації м'язів. Дійсно, різні типи стовбурових та клітин-попередників в сукупності впливають на регенерацію м'язів, безпосередньо

шляхом диференціювання в м'язові клітини, або вивільнення паракринових факторів (тобто факторів росту, цитокінів), які контролюють регенеративну реакцію СК [157, 169, 216, 223, 242]. Відповідно до експериментальних даних, FAP – це перехідне джерело факторів про-диференціації для диференціації та синтезу міобластів і вказано, що фармакологічне інгібування проліферації та диференціювання FAP призводить до порушення регенерації м'язів [93, 212, 223, 225]. З іншого боку, під час хронічної дегенерації – регенерації FAP є основним джерелом фіброзу [162, 284]. Таким чином, FAP відіграють значну міогенну та трофічну роль у фізіології м'язів під час регенерації [157, 175, 188]. Після гострої травми FAP активізуються та посилюються, а деякі усуваються апоптозом, індукованим прозапальними цитокінами, такими як IL4 [162]. Регенерація також може включати в себе злиття клітин нерезидентів крові з міофібром, однак це відбувається рідко. Перицити розташовані в мікросудинах і беруть участь в рості кровоносних судин, ремоделюванні, гомеостазі. Перицити в скелетних м'язах є складовими ніші супутникової клітини, де вони виділяють молекули, такі як IGF1 або ангіопоедин-1 для модуляції їх поведінки, а також постнатальний ріст міофібри та введення супутникових клітин у спокій [224]. Після травми м'язів перицити активізуються і утворюють мезоангіобласти, які мають менший міогенний потенціал порівняно з СК [153, 188, 208, 224].

За літературними даними, мезенхімальні клітини, які експресують фактор транскрипції Twist2, діють як міогенні прогеніти, проте мають селективний потенціал диференціації волокон типу ІІв [129]. Повідомлялося також, що PIS (Pw1 + інтерстиціальні клітини) ефективно прищеплюються та сприяють регенерації міофібри після внутрішньом'язової ін'єкції. Ген Pw1 експресується в супутникових клітинах. Зв'язок між PIS, FAP, мезоангіобластами та клітинами Twist2 + залишається не достатньо вивченим. За даними літератури, проводиться ідентифікації та класифікації субпопуляцій міогенних клітин після травми м'язів для оцінки відносного потенціалу та ролі міогенних та стромальних клітин [162, 188]. При гіперекспресії VEGF *in vivo* в експерименті призводила до збільшення проліферації супутникових клітин [216, 256]. Диференціювання міобластів через

VEGF також стимулює ангиогенез [209, 216]. Крім того, кілька інших факторів, таких як MCP-1 (моноцитарний хемотаксичний білок), ANGPT2, NGF (фактор росту нервів), синтезований ендотеліальними клітинами на ранніх стадіях регенерації, можуть стимулювати ангиогенез і, таким чином, відновити м'язи. Періендотеліальні клітини (фібробласти з ендомізію та клітин гладкої мускулатури) стабілізують регеновані судини і здатні стимулювати самовідновлення [122, 154, 224, 254]. Дані останніх досліджень показали, що встановлення функціональної координації між СК та іншими типами клітин всередині м'язової ніші, включаючи мотонейрони, ендотеліальні клітини, імунні клітини, фіброгенні клітини та адипогенні попередники, має вирішальне значення для відновлення м'язів та гомеостазу. Серед неклітинних компонентів ніші СК позаклітинна матриця (ECM) відіграє вирішальну роль, зазнаючи тимчасового ремоделювання під час гострої травми з подальшим швидким припиненням, щоб уникнути патологічного фіброзу та дегенерації тканин. Хоча останні дані показали, що міогенні клітини можуть продукувати компоненти ECM [104, 168, 203, 218], а нещодавно ідентифікована популяція інтерстиціальних теноцитів була залучена до експерименту з ECM *in vivo* (Giordani et al., 2019) [154, 169]. Основними клітинними джерелами білків ECM є фібробласти, міофібробласти та FAPs. Хоча супутникові клітини відіграють вирішальну роль у відновленні міофібри після травми, очевидно, що інші типи клітин впливають на процес регенерації. Наприклад, FAP перебувають у м'язовій інтерстиції, експресують поверхневі маркери PDGFR α (рецептор фактора росту, отриманого тромбоцитами), Sc α 1 (антиген 1 стовбурової клітини) та CD34 і здатні диференціюватися на фібробласти та / або адипоцити [60, 61, 251, 265, 278, 292].

Після травми процес регенерації передбачає участь різних типів клітин, які модулюють їх поведінку відповідно до секреторних та біомеханічних даних. Незважаючи на те, що трансплантація стовбурових клітин м'язів після травми показала успішну часткову регенерацію, проте в них низька виживаність та самовідновлення та нездатність до дифузії в тканини. При поєднання стовбурових клітин, факторів росту та матриксів з біоінженерії регенеративна

здатність пересаджених СК підвищується, що створює перспективи для подальших досліджень [104, 134, 151, 262].

1.3 Експериментальне обґрунтування використання PRP в процесах репаративної регенерації м'язової тканини

Сучасні принципи лікування м'язових травм полягають в наданні першої допомоги за принципом RICE (відпочинок, лід, стиснення та підняття). Мета RICE – зупинити спричинену травмою кровотечу в м'язову тканину і тим самим мінімізувати ступінь травми [10, 21, 59, 68, 87, 107]. Лікування травмованої скелетної мускулатури повинно здійснюватися негайною іммобілізацією травмованого м'яза (клінічно відносна нерухомість / уникнення м'язових скорочень). Однак тривалість іммобілізації повинна бути обмежена періодом, достатнім для отримання рубця достатньої сили, щоб перенести сили, викликані видаленням без повторного розриву, і повернення до активності (мобілізація) слід починати поступово в межах болю [59, 68, 87, 107]. Раннє повернення до діяльності потрібно для оптимізації відновлення м'яза та відновлення гнучкості та сили травмованого скелетного м'яза на рівень до травм [31, 242, 247].

Згідно з літературними даними встановлена ефективність застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові у вигляді локальної терапії при лікуванні хворих на остеоартроз, яка полягала в зменшенні запальних та дегенеративних процесів в суглобах, та сприяла покращенню якості життя пацієнтів [11, 13, 23, 198, 270, 271]. Наукові дослідження останніх десятиліть вказують на те, що тромбоцити виконують величезну кількість функцій, на додаток до основної їх ролі – участі у гемостазі. Відновлення пошкоджених тканин ініціюється агрегацією тромбоцитів, утворенням фібринового згустку та вивільненням факторів росту з тромбоцитів, пошкоджених клітин та екстрацелюлярного матриксу [18, 219, 230, 280]. Тромбоцити являють собою одне з найбільших джерел факторів росту в організмі, а, отже, принаймні частково, можуть впливати на процеси загоєння тканини. Кілька потужних

ангіогенних стимуляторів містяться в тромбоцитах, в тому числі VEGF, тромбоцитарного фактора росту ендотелію (PDEGF), EGF та PDGF [11, 146, 210, 279, 274]. Ці тромбоцитарні фактори росту стимулюють проліферацію ендотеліальних клітин та утворення капілярів. Керування механізмами, що впливають на співвідношення проангіогенних та антиангіогенних факторів в тромбоцитах, а також на їх вивільнення, дає можливість прицільно впливати на неоангіогенез та загоєння дефектів тканин [11, 210, 219, 222, 273]. Важливі результати щодо сили протизапального ефекту збагаченої тромбоцитами плазми крові отримано К. Weizel і співавт. (2014) [195] які виявили пригнічення запалення під впливом збагаченої тромбоцитами плазми крові [82, 112, 115, 195, 217, 232, 236, 266]. В механізмах індукції загоєння м'язової тканини PRP основну функцію виконують фактори росту, яких на даний час відомо: тромбоцитарний фактор росту, трансформуючий фактор росту – 1, тромбоцитарний фактор ангіогенезу, інсуліноподібний фактор росту, остеокальцин, остеонектин, фібриноген та інші [102, 120, 125, 246, 289]. Їх дія проявляється локально за рахунок залучення недиференційованих клітин до нового сформованого матриксу і запуску клітинного ділення в ділянці ушкодження. Однак ці механізми потребують уточнення та додаткового вивчення. Також PRP змінює і регулює функцію первинних факторів росту. В збагаченій тромбоцитами плазмі крові містяться основні фактори росту, які виділяються разом із цитокінами (IL-1) під час руйнування мембрани клітинних елементів з α -гранул тромбоцитів [78, 227, 243, 275]. Основні цитокіни, виявлені в тромбоцитах, включають: тромбоцитарний фактор росту (PDGF), трансформуючий фактор росту β (TGF- β), інсулін подібний фактор росту (IGF-I, IGF-II), фактор росту фібробластів (FGF), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту ендотелію судин (VEGF або PDAF), фактор росту ендотеліальних клітин (PDEGF) і плацентарні ростові фактори (PLGF-1/-2); тромбоспондин, остеонектин [8, 64, 143, 145, 147, 184, 185, 197, 284].

В сучасній літературі представлена величезна кількість даних, що демонструють успішне використання плазми збагаченої тромбоцитами в

експериментах та у рандомізованих плацебо контрольованих клінічних досліджень, та доводить ефективність застосування PRP при патологіях опорно-рухового апарату, зокрема при артрозах II-III ст., тендинітах, лігаментитах, епікондилітах, плече-лопатковому периартриті, субакроміальному синдромі, плантарному фасциїті [8, 19, 23, 44, 66, 89, 106, 186, 192, 193, 194, 234, 237, 238]. Ефективність використання PRP у стоматології та щелепно-лицьовій хірургії для регенерації кісткових дефектів, для прискорення процесів остеоінтеграції та зниження ризику відторгнення зубних імплантатів, скорочення періоду реабілітації після щелепно-лицьових операцій, підтверджена великою кількістю досліджень [53, 69, 71, 74, 78, 86, 124, 162, 171, 76, 178, 219, 234, 235, 242]. За даними літератури плазма збагачена тромбоцитами застосовується для загоєння хронічних ран та трофічних виразок шкіри різної етіології [9, 54, 72, 76, 95, 132, 161, 288]. Використання PRP в нейрохірургії та неврології дозволяє зняти запальний процес, прискорити регенерацію пошкоджених нервових стовбурів, покращити трофічні та регенеративні процеси у між хребцевих дисках [20, 34, 70, 108]. Також значно кількість клінічних та експериментальних досліджень присвячена можливості використання PRP у гінекології, репродуктивній медицині, в косметології та трихології [6, 65, 212, 248, 272, 288]. Значних успіхів було досягнуто при використанні PRP у спортивній медицині, наприклад, прискорення періоду реабілітації після спортивних травм [8, 28, 58, 89, 109, 110, 125, 140, 143, 149, 160, 182, 183, 229, 298]. А також PRP може бути використана як джерело факторів росту для стимуляції хондроцитів у хрящових тканинно-інженерних конструкціях у зв'язку з посиленням синтезу протеогліканів та колагену [101, 150, 234].

Окрім ростових факторів, PRP містить низку біологічно активних субстанцій, які чинять протизапальну, антибактеріальну і фунгіцидну дію, що може мати позитивний ефект при лікуванні м'язових травм [149, 176, 177, 189, 210]. В проведеному огляді Isabel Andia (2015) [110] показала ефективність терапії PRP при травмі м'язів. Плазма, збагачена тромбоцитами, привертає велику увагу при лікуванні м'язових травм за її потенційного сприятливого

впливу як в оперативних, так і в неоперативних умовах [37, 58, 109, 110, 125, 140, 143, 149, 160, 182, 183]. Згідно даних літератури встановлено, що PRP викликає клітинну проліферацію та диференціювання, вироблення різних факторів росту, регенерацію м'язів та зміни експресії генів [110, 125, 267]. Було опубліковано кілька клінічних досліджень та випробувань щодо застосування PRP при м'язових травмах з різними результатами [8, 9, 15, 40, 206, 231]. Використання PRP в клінічних умовах вимагає контрольованих клінічних випробувань, з послідовною методикою щодо дозування та препарату [15, 88, 90, 97, 111, 231, 240]. Kyle N. Kunze і співавтори (2019) [239] провівши аналіз експериментальних досліджень підсумували, що у більшості досліджень лікування PRP збільшувало проліферацію міоцитів, експресію фактору росту (наприклад, PDGF-A / B та VEGF), набір лейкоцитів та ангиогенез у м'язових моделях. порівняно з контрольними групами. Дані фундаментальних наукових досліджень проведених *in vitro* та *in vivo* свідчать про те, що PRP може послужити ефективним способом лікування, який може прискорити процес загоєння м'язових патологій, виходячи із отриманих результатів на клітинному та тканинному рівнях [113, 129, 240, 241]. Li і співавтори [129] повідомили, що PRP регулює експресію маркерів стовбурових клітин у hMDPC. PRP збільшує проліферацію міобластів скелетних м'язів людини. Рання диференціація клітин спостерігалася також у додаткових трьох дослідженнях *in vitro* [19, 144, 239]. Імовірно, що лікування PRP прискорювало регенерацію м'язів та зменшувало фіброз порівняно з контролем [129, 233]. P.M. Denaroli повідомляє про значне збільшення рецепторів VEGF, а також факторів росту, PDGF, Flt-1 та EGF у групах, які лікувались PRP, збільшує ангиогенез порівняно з контрольною групою [129, 233, 294].

Zaky S.H. та співавтори [299] культивували людські мезенхімальні клітини в трьох різних середовищах: фетальна бичача сироватка + FGF2, фетальна бичача сироватка + 5 % PRP та лише PRP. Автори виявили найкраще утворення хрящової популяції в середовищі, що містило лише PRP.

Значна кількість наукових досліджень присвячена визначенню оптимального середовища факторів росту, що сприяє регенерації м'язів та їх загоєнню. Різниця реакцій міоцитів і міобластів на різні препарати PRP демонструє необхідність кращого базового наукового розуміння м'язової регенерації та загоєння. Як в клінічних, так і в базових наукових дослідженнях щодо PRP, автори погоджуються з Chahla et al, що протокол підготовки PRP повинен бути чітко сформульований і відтворений як в базових науках, так і в клінічних дослідженнях, так що результати в ході досліджень можна порівняти з кінцевим чином, щоб ми могли визначити оптимальний препарат для лікування як хронічних, так і гострих м'язових травм [41, 97, 111, 123, 124, 175, 180, 249, 269]. В даний час мало клінічних доказів на підтримку використання PRP при травмах скелетних м'язів. Майбутнє PRP-терапії це не тільки удосконалення протоколів застосування, а й створення комбінованих продуктів. Більше того, нестандартні алогенні продукти PRP можуть стати частиною рішення для спортивних травм [164, 166, 174, 207, 228]. Проаналізовані літературні дані свідчать на користь подальших досліджень для визначення оптимальної цитології, дозування, термінів та методу доставки PRP при хронічній та гострій патології м'язів.

1.4 Експериментальне обґрунтування використання стовбурових клітин в процесах репаративної регенерації м'язової тканини

Згідно даних літератури в клітинній терапії використовуються клітини, як дорослого організму, так і ембріональні. Особливе місце серед них займають мезенхімальні стовбурові (мультипотентні стромальні) клітини (МСК). МСК – це недиференційовані клітини, що здатні до самовідновлення і диференціювання в різні типи клітин, а також до експресії маркерів, характерних недиференційованим клітинам [47, 48, 49, 67, 84, 100, 298]. Багато було з'ясовано в останні роки про ізоляцію і характеристики МСК, і про контроль над їх диференціюванням. Ці клітини викликали великий інтерес через перспективи їх використання в регенеративній медицині та тканинній

інженерії [100, 116, 144, 204, 291]. МСК характеризуються імунокоригуючими властивостями, здатністю диференціюватись в декілька типів клітин, можливістю отримання великої кількості клітин за короткий термін та відносною простотою культивування. За літературними даними відомо, що МСК успішно виділено з усіх тканин організму [22, 67, 78, 84, 137, 172, 204], але основна увага приділена жировій тканині, кістковому мозку і провізорній ембріональній тканинам (плацента, пуповина). Найчастіше використовують МСК отримані із кісткового мозку або жирової тканини [67, 78, 298, 299]. Дані клітини є дорослими стовбуровими клітинами і тому мають обмеження при застосуванні у медицині зумовлені особливостями реакції на них імунної системи реципієнта, навіть при алотрансплантації.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) були виділені практично з усіх тканин та органів, однак, відсутність специфічних маркерів зробила їхню характеристику складною, особливо з огляду на недавній звіт, який показує, що мезенхімальні стромальні клітини з різних тканин мають різний профіль транскриптоми та потенціал диференціації. Популяції стовбурових клітин знайдені в більшості дорослих тканин і їх диференційований потенціал може відображати локальні клітинні популяції. Були описані епідермальні, мезенхімальні, невральні і гепато-стовбурові клітини. [].

Можливо, що в дорослому організмі ці клітини є резервуаром репаративних клітин, які мобілізуються відповідними цитокінами при ушкодженні і мігрують в місце ушкодження, де в кооперації з локальними клітинами беруть участь у репаративній відповіді [143, 213].

З огляду на розширений стан аналізу інтерстиціальних клітин у м'язах, важливо було б встановити їхні родові зв'язки та міогенний потенціал та чіткіше визначити загальні особливості МСК [48, 172, 244]. Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) ссавців вважаються найбільш перспективним видом аутогенного й алогенного матеріалу у клітинній регенеративній терапії [74, 98, 117, 173, 220, 263]. Зокрема, велика кількість публікацій, присвячених результатам клінічного використання МСК у лікуванні тварин за патології

апарату руху, свідчить про обґрунтованість цього методу та наукове його значення [98, 110, 132, 184, 188, 189, 257, 261].

Здатність МСК диференціюватись в різні типи тканин була доведена в дослідженнях *in vivo*. При внутрішньовенному введенні МСК мігрують в тканини різного типу, і під впливом місцевого мікрооточення здійснюють активацію нової генетичної програми клітини, що забезпечує зміну її спеціалізації [67, 84, 137, 157, 202, 228].

Значний інтерес має використання клітинної біотехнології для лікування тварин з травмами апарату руху. Застосування попередників кісткових клітин з метою оптимізації перебігу репаративних процесів при переломах і їх ускладненнях має патогенетичне обґрунтування [172, 225, 260]. Ряд авторів доведена можливість диференціювання МСК *in vitro* в остеогенному напрямі [47, 107, 118]. У процесі культивування МСК синтезували елементи волокнистої міжклітинної речовини – колагенового матриксу, на якому осідали мінеральні компоненти, формуючи вузлики мінералізації, що є ознакою остеобластичного фенотипу [47, 153].

МСК з різних тканин мають значні відмінності у доступності та безпечності [67, 79, 80, 84]. Вартонові драглі пуповини (пупкового канатика), містять клітини, які збереглися з ранніх етапів ембріогенезу, оскільки пуповина, є похідним жовткового мішка та алантоїсу [81, 84, 261]. В клітинному складі пуповини переважають фібробластоподібні клітини та зберігають плюрипотентний стовбуровий потенціал [47, 67]. Є дані [84] про можливість експресії ними ембріональних маркерів Oct4 і Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1, SSEA-4). Дані клітини характеризуються відмінностями від зрілого імунофенотипу, що дає можливість для алотрансплантації [85, 86]. При отриманні клітин з пуповини немає морально-етичного конфлікту та проведення виділення МСК з пупкового канатика є нескладним. За літературними даними розроблено і запроваджено методи кріоконсервації МСК [46, 74]. При експериментальному вивченні в дослідах на тваринах з імуносупресією встановлено, що при внутрішньовенному чи підшкірному введенні цих клітин не виявлено їх відторгнення або критичного

негативного впливу. При одноразовому введенні МСК тваринам без імуносупресії відторгнення не відбувалося. Отже, згідно даних літератури про виражені імуносупресивні властивості МСК пуповини порівнюючи з іншими клітинами встановлено перспективність використання їх в регенеративній медицині. Актуальним питанням є розробка удосконалення методів отримання ідентифікації та клінічного застосування МСК. Потребує подальшого вивчення питання якісного складу та зміни характеристик фенотипу клітин в умовах культивування. Проводиться вивчення окремих властивостей МСК, проте відсутні роботи про можливість їх доклінічного використання з терапевтичною метою на тваринах. Тому розробка протоколу отримання ембріональних МСК, дослідження їх біологічних властивостей в умовах культивування, *in vitro*, та використання з метою корекції при травматичному ураженні м'язів є предметом даного дослідження [47, 48].

Мезенхімальні стовбурові клітини, як стало відомо в останні роки, володіють ще декількома унікальними особливостями – низькою імуногенністю та імуносупресивними властивостями, а також мають роль модуляторів міжлімфоцитарних взаємодій. Ці властивості МСК почали широко використовувати в клітинній терапії [149, 227]. Використання, саме мезенхімальних стовбурових клітин для регенеративної терапії завдяки своїм унікальним біологічним властивостям потребує і подальших досліджень.

Водночас, залишаються мало дослідженими питання вибору найбільш ефективних методичних підходів для застосування мезенхімальних стовбурових клітин за uszkodження м'язової тканини. Остаточо не визначено дози та шляхи їх введення в кожному конкретному випадку, протипоказання до їх застосування.

Отже, дослідження властивостей мезенхімальних стовбурових клітин тварин та їх використання за експериментального uszkodження м'язової тканини є досить актуальним і своєчасним завданням, яке сприятиме розробленню науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії при травмі м'язів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота виконана на базі кафедри патологічної фізіології, патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною центральної науково-дослідної лабораторії (свідоцтво про атестацію № 001/18 від 26 вересня 2018 року) та між кафедральної навчально-дослідної лабораторії (свідоцтво про атестацію №132/17 видане 29 грудня 2017 року) Тернопільського Національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.

При роботі з тваринами дотримувались правил поводження з експериментальними тваринами згідно директиви Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання постанов, законів, адміністративних положень Держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються для наукової мети [136]. Всі експериментальні дослідження виконано з дотриманням норм Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідження та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.) і ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001), що підтверджено комісією з біоетики Тернопільського національного університету імені І.Я. Горбачевського (протокол засідання № 59 від 05.06.2020 р.) [50, 152, 165].

2.1 Групи тварин для дослідження та експериментальна модель

Експериментальне дослідження виконано на 132 нелінійних білих щурах масою 180–210 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Центральної науково-дослідної лабораторії з підтриманням харчового і питного режимів, рекомендованому нормами утримання лабораторних тварин. Усіх тварин було поділено на чотири групи – контрольну (12 щурів) та дослідні: I – травма стегнового м'язу (доби спостереження 1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша (40 тварин)), II – травма стегнового м'язу з корекцією збагаченою

тромбоцитами плазмою крові (добі спостереження 1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша (40 тварин)), III – травма стегнового м'язу із корекцією стовбуровими клітинами (добі спостереження 1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша (40 тварин)) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Розподіл тварин за експериментальними групами

Група	Кількість тварин n	Метод корекції травми
I група	40	без корекції
II група	40	корекція збагаченою тромбоцитами плазмою крові
III група	40	корекція стовбуровими клітинами
Контрольна	12	інтактні тварини

Тваринам дослідної групи під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг\кг маси тіла щура внутрішньочеревно) за допомогою ударного механізму моделювали травму стегнового м'язу. Травму стегнового м'язу моделювали шляхом нанесення однократного дозованого удару спеціально розробленим пристроєм по лівому стегну з циліндричною поверхнею, який не викликав пошкодження шкіри та перелому стегнової кістки, який викликав травму стегнового м'язу. При роботі з тваринами дотримувались правил поведінки з експериментальними тваринами [50]. Тупу травму м'язів стегна моделювали шляхом нанесення однократного дозованого удару по м'язу ударним пристроєм з діаметром 1 см² та енергією 0,61 Дж.

Протокол проведення експериментального дослідження

Проводять вимір маси білого щура, визначають вид загального знечулення, загальну кількість наркотичної речовини, виходячи з нанесення механічного пошкодження м'язової тканини. Перед нанесенням механічної травми тварину іммобілізують на препарувальному столику, під тіопенталовим знечуленням (з розрахунку 40мг\кг), здійснюють механічне пошкодження стегнового м'язу.

Таблиця 2.2 – Дизайн дослідження

Етапи дослідження	Методи дослідження	Кількість тварин	Терміни дослідження
1	2	3	4
Відпрацювати методику отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові	Забір крові	Білі щурі	
	Перше центрифугування		
	Друге центрифугування		
	Оцінка життєдіяльності клітин та вивчення морфології клітин		
Відпрацювати методику отримання мезенхімальних стовбурових клітин	Виділення з підшкірної м'язової тканини плодів щурів	Самки білих щурів	21-ша – 24-та доба дослідження
	Оцінка життєздатності клітин		
	Морфологія клітин в культурі		
Провести експеримент in vitro про вплив PRP на процеси клітинної проліферації	Для експерименту використовували МСК із пуповинного канатика, МСК із м'язів плода та фібробласти		
Розробити модель травматичного ушкодження м'язів у щурів та оцінити зміни у посттравматичному періоді	Оцінка перебігу посттравматичного періоду	40 щурів	1-ша -21-ша доба експерименту 1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша доба експерименту
	Оцінка ПОЛ та АОС		
	Оцінка маркерів ендогенної інтоксикації		
	Визначення вмісту цитокінів сироватки крові		
	Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ		
	Гістологічне, дослідження печінки, нирки, легені, м'язів		
	Гістохімічне дослідження м'язів		

Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4
Використання збагаченої тромбоцитами плазми крові для корекції при травматичному ушкодженні м'язів у щурів	Оцінка перебігу посттравматичного періоду	40 щурів	1-ша -21-ша доба експерименту
	Оцінка ПОЛ та АОС		1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша доба експерименту
	Оцінка маркерів ендогенної інтоксикації		
	Визначення вмісту цитокінів сироватки крові		
	Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ		
	Гістологічне дослідження печінки, нирки, легені, м'язів		
	Гістохімічне дослідження м'язів		
Використання МСК для корекції при травматичному ушкодженні м'язів у щурів	Оцінка перебігу посттравматичного періоду	40 щурів	1-ша -21-ша доба експерименту
	Оцінка ПОЛ та АОС		1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша доба експерименту
	Оцінка маркерів ендогенної інтоксикації		
	Визначення вмісту цитокінів сироватки крові		
	Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ		
	Гістологічне дослідження печінки, нирки, легені, м'язової тканини		
	Гістохімічне дослідження м'язів		
Контрольна група (інтактні)		12 щурів	

Пристрій для нанесення травми через удар було зафіксовано, для стабілізації з метою уникнення коливань при падінні ваги. Проводилося контрольоване ушкодження з метою травмування в одній і тій же ділянці. Попередньо тварин знеболювали розчином тіопенталу (з розрахунку 40мг\кг) та проводили травматичне ушкодження в лівій задній кінцівці в середній третині стегового м'язу та були розподілені на чотири групи в залежності від методів корекції: перша група – інтактні, друга група – тварини з травматичним ушкодженням м'язів стегна, третя група – тварини з травматичним ушкодженням м'язів стегна яким в ділянку травми вводили 0, 1 мл. PRP, четверта група – тварини з травматичним ушкодженням м'язів стегна яким внутрішньоочеревинно вводили мезенхімальні стовбурові клітини разовою ін'єкцією з розрахунку 1 млн. клітин на 1кг. маси тіла.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Методи дослідження процесів ліпопероксидації та стану антиоксидантного захисту.

Концентрацію ТБК-активних продуктів вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою [80].

Зміни перекисного окислення ліпідів у пацієнток оцінювали за вмістом в плазмі крові первинних продуктів перекисного окислення ліпідів – дієнових кон'югант (ДК) та вторинних – малонового діальдегіду (ДК). Дієнові кон'юганти визначали за методикою І. Д. Стальної (1977) [79]. Малоновий діальдегід визначали за методикою І. Д. Стальної, М. Г. Гарішвілі (1987) [80].

Активність ферментативної ланки антиоксидантної системи вивчали за рівнем каталази в еритроцитах периферичної крові. Активність каталази визначали спектрофотометрично. Стан активності оксидантного стресу оцінювали за вмістом у плазмі крові ТБК-активних продуктів за стандартними методиками [80]. Активність супероксиддисмутази визначали за методикою

С. Чевари, у модифікації Е. Дубиніної [85]. Оцінювали активність каталази [57] та антипрооксидантний індекс АПІ, який свідчить про стан антиоксидантних і прооксидантних систем [4]. Стан антиоксидантної та прооксидантної систем можна визначати через показник АПІ, що визначається за формулою:

$$\text{АПІ} = \frac{\text{Акаталази} \times 100}{\text{СМДА}}$$

2.2.2 Визначення показників ендogenous інтоксикації

Рівень ендogenous інтоксикації оцінювали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) у плазмі крові, визначенням лейкоцитарного (ЛІІ) та еритроцитарного (ЕІІ) індексів інтоксикації.

Визначення вмісту МСМ проводили згідно методики [46]. Із сироватки крові виділяли кислоторозчинну фракцію, яку отримували шляхом додавання до 0,2 мл сироватки 1,8 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти. Вміст МСМ визначали при довжині хвиль 254 (визначаються ланцюгові амінокислоти) та 280 нм (визначаються ароматичні амінокислоти), в подальшому розраховували коефіцієнт Кс (МСМ 280нм/ МСМ 254нм).

ЛІІ – це співвідношення популяцій клітин крові, які дозволяють оцінити переважання відповіді про– або протизапальних цитокінів. Визначення лейкоцитарного індексу інтоксикації проводили згідно формули, запропонованої Я. Я. Кальф-Каліфом у модифікації Б.А. Рейса [77].

ЛІІ в модифікації Б.А. Рейса, ЛІІ Рейса = (мієлоцити+– метамієлоцити + паличкоядерні НГ + сегментоядерні НГ) / (моноцити + лімфоцити + еозинофільні гранулоцити)

$$\text{ЛІІ}_r = (\text{с.} + \text{п.} + \text{ю.} + \text{мц.}) / (\text{мон.} + \text{лімф.} + \text{е}).$$

ЕІІ визначали методикою, в основі якої лежать уявлення про еритроцити як універсальний адсорбент, який дозволяє оцінити рівень ЕІ за зміною сорбційної здатності еритроцитів полярного, практично не проникного через їхню мембрану метиленового синього [46, 76]. Кількість поглинутого барвника (у відсотках) вираховували за такою формулою:

$$A = 100 - C \times 100 / B,$$

де А – кількість поглинутого барвника, %;

В – оптична густина вихідного розчину, ум. од. екстинкції;

С – оптична густина розчину барвника після інкубації з еритроцита

2.2.3 Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ

Визначення загальної протеолітичної активності плазми крові та проводили за лізисом азоальбуміну, азоказеїну і азоколу за допомогою набору реактивів «Simko Ltd» (Україна) за методом [12], який полягає в тому, що при інкубації білкових азосполук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться у тканинах, відбувається лізис азоальбуміну (розпад низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних протеїнів) та азоколагену (колагеноліз), інтенсивність якого оцінювали за ступенем забарвлення інкубаційного середовища на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 440 нм. Протеолітичну активність визначали в одиницях екстинкції на 1 мл плазми за 1 годину.

Вміст $\alpha 2$ -макроглобуліну ($\alpha 2$ -МГ) визначали за методом, принцип якого полягає в тому, що $\alpha 2$ -МГ утворює з трипсином активний комплекс, який є нечутливим до дії інгібітору з бобів сої. Для виконання методики використовували трипсин («Srofa», Чехія) [81]. Концентрацію $\alpha 2$ -МГ визначали за калібрувальним графіком, в якому по осі абсцис відкладали кількість трипсину, а по осі ординат – оптичну щільність проб, в яких відбувся гідроліз N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду (БАПНА) відповідною концентрацією трипсину. Концентрацію $\alpha 2$ -МГ виражали в г/л у сироватці крові [83].

Визначення вмісту $\alpha 1$ -інгібітора протеаз ($\alpha 1$ -ІП) в сироватці крові проводили методом, що базується на здатності $\alpha 1$ -ІП сироватки крові пригнічувати гідроліз трипсином БАПНА. В той же час трипсин у комплексі з $\alpha 2$ -МГ здатний розщеплювати БАПНА. Вміст $\alpha 1$ -ІП визначали за різницею між відомою кількістю трипсину і кількістю ферменту, що залишився після його взаємодії з інгібіторами плазми. Вміст $\alpha 1$ -ІП визначали за калібрувальним графіком, в якому по осі абсцис

відкладено кількість трипсину (1 – 10 мкг), а по осі ординат – оптична щільність проб, в яких відбувся гідроліз БАПНА відповідною концентрацією трипсину. Вміст α 1-ІІ у сироватці крові виражали в мкмоль/л [45].

Розраховували індекс протеолізу (ІІ), що відображає напруженість або «керованість» протеолітичних процесів, як відношення ЗПА до сумарної інгібіторної ємності (сума активності α 1-ІІ і α 2-МГ) [12, 27].

Для приготування гомогенату м'язової тканину розтирали за допомогою гомогенізатора при 4 °С і суспендували в 9 об'ємах 0, 25 М розчину цукрози з 0, 001 М Na₂ЕДТА, рН 7, 4. Сполучнотканинні елементи, які залишились в середовищі, видаляли центрифугуванням (1000 об/хв протягом 3 хв) при охолодженні. Надосадову частина гомогенату печінки використовували для досліджень. Загальну активність катепсину D в гомогенаті тканини печінки визначали методом Дингла у модифікації [64]. Активність ферменту виражали в мкМ тирозину/(мг білка×год).

2.2.4 Визначення вмісту цитокінів сироватки крові

Визначення вмісту цитокінів сироватки крові (TNF α , IL1 β , IL6, IL10) проводили на аналізаторі «Multiscan FC» (Thermo Scietific, Фінляндія) методом твердофазового імуноферментного аналізу з використанням наборів реагентів «RayBio» виробництва «RayBiotech» (США) згідно інструкції фірми виробника.

2.3 Методика отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин.

Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові відбувалося у два етапи з дотриманням всіх правил стерильності, яке розпочинали з отримання крові білих щурів шляхом кровопускання з серця, за допомогою стандартних наборів для забору крові: одноразових стерильних катетерів та вакуумних пробірок з антикоагулянтном у співвідношенні кров : антикоагулянт – 9:1. Після забору крові кожен пробірку перевертали декілька разів для забезпечення

перемішування крові з антикоагулянтом та поміщали у лабораторну центрифугу LMC-3000 “Biosan” (Латвія). Проводили двоетапне центрифугування : перше – 10 хвилин зі швидкістю 1600 об./хв. для осадження еритроцитів та лейкоцитів, Після першого центрифугування плазму відокремлювали від концентрату еритроцитів та проводили другий етап центрифугування – 10 хвилин зі швидкістю 2100 об./хв.

Для оцінки життєздатності тромбоцитів використовували барвник трипановий синій (Sigma, США), інкубували протягом 2-3 хвилин, 20 мкл забарвленої суспензії клітин вносили в гемоцитометр (камеру Горяєва) та здійснювали підрахунок живих і мертвих клітин на інвертованому мікроскопі “Delta Optical” (Польща). За цих умов живі клітини відрізнялися від нежиттєздатних тим, що не поглинали барвника і, відповідно, не забарвлювались.

Методика отримання мезенхімальних стовбурових клітин.

Виділення МСК і дослідження їх характеристик проведені співробітниками лабораторії клітинних культур сектору експериментальних та клінічних досліджень міжкафедрально-навчально дослідної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського під керівництвом кандидата медичних наук, доцента Довгалюк А. І.

Для експерименту з дослідження регенерації пошкоджень скелетних м'язів під впливом стовбурових клітин використовували МСК, виділені із підшкірної м'язової тканини плодів щурів (міогенні МСК). Вирощування клітин здійснювали у CO₂-інкубаторі за температури 37 °C та 5 %-вої концентрації CO₂ до утворення конфлюенту 90–100 %.

Для цього з культурального флакона з 90 % конфлюентом міогенних МСК відбирали кондиційне середовище і промивали клітини буферним розчином HBSS (Gibco). Для відкріплення клітин від дна культурального флакону використовували ферментний препарат Tryple (Gibco) та інкубували 5

хв при 37° С. Дію дисоціюючого розчину нейтралізували кондиційним середовищем.

Далі клітинну суспензію переносити у центрифужну пробірку і осаджували МСК впродовж 8 хв при 1700 об/хв. Отриманий осад розчиняли в 1 мл розчину HBSS і повторно відцентрифугували клітини за тих самих умов. Далі осад розчиняли у фізіологічному розчині, отриману клітинну суспензію профільтровували через сито з діаметром пор 100 мкм і підраховували кількість виділених клітин за допомогою гемоцитометра – камери Горяєва з використанням вітального барвника трипанового синього.

Експериментальним тваринам вводили мезенхімальні стовбурові клітини внутрішньоочеревинно разовою ін'єкцією з розрахунку 1 млн. клітин на 1кг. маси тіла. Для максимального збереження життєздатності клітин введення МСК здійснювали протягом 30 хвилин після отримання суспензії.

2.4 Обґрунтування в експерименті *in vitro* впливу PRP на процеси регенерації

Для експерименту із вивчення стимулюючих ефектів PRP на клітинну проліферацію було використано такі клітинні лінії щурів як МСК із пуповинного канатика, МСК із м'язів плода та фібробласти. Отримання первинних культур здійснювали наступним чином:

- 1) Із віварію взяли самку на пізній стадії гестації.
- 2) Евтаназію здійснювали з використанням тіопенталу з дотриманням вимог біоетики.
- 3) Із виділених плодів забирали пуповинні канатики, шматочки шкіри і м'язів, відмили їх від крові стерильним буферним розчином HBSS з додаванням 1 % пеніциліну-стрептоміцину.
- 4) Далі для дисоціації клітинної маси та отримання життєздатних МСК використовували ферментативний метод. Для цього зразки тканини подрібнювали скальпелем на фрагменти розміром 0, 5-2 мм 3, переносили в

центрифужні пробірки з 2 мл ростового середовища DMEM/F12 Advanced та 0, 2 мл колагенази I у концентрації 0, 075 мг/мл та перемішували, не допускаючи флотації.

5) Пробірки з первинним матеріалом та колагеназою інкубували в термобані за температури 37° C упродовж 70 хв (пуповинні канатики), 75 хв (підшкірні м'язи) чи 85 хв (шматочки шкіри), ретельно перемішуючи кожні 15 хв.

6) Після ферментації у пробірки додали по 4 мл ростового середовища, пропіпетували і відцентрифугували 5 хв при 300 g. Процедуру повторили двічі.

7) Отриманий осад ресуспендували у 7 мл DMEM/F12 Advanced з додаванням 10 % ембріональної сироватки телят (ЕСТ) та висадили у культуральні флакони.

8) Культивування здійснювали в CO₂ інкубаторі за температури 37 °C та концентрації CO₂ – 5 %.

Здійснена процедура трипсинізації – відкріплення клітин від дна культурального флакону за допомогою ферменту Tryple. Для цього відібрали все середовище, промили буферним розчином HBSS та нашарували трипсин. Далі трипсинізували 5 хв в умовах CO₂-інкубатора. Після інкубування перевірили під мікроскопом стан культури. Після цього нейтралізували дію трипсину на клітини середовищем, активно змивали клітини з дна культурального пластику та центрифугували 8 хв при 1700 об/хв. Далі осад розчинили у свіжому середовищі та підрахували.

Для експерименту було закладено культуральні флакони (25 см²). В кожен з них було внесено по 250 000 клітин, розчинених у DMEMр. Клітини у флаконах залишили на добу в CO₂ – інкубаторі для прикріплення та розпластування клітин. Через 24 год було замінено середовище в усіх флаконах. Дизайн експерименту включав контрольну групу – з додаванням 5 % ембріональної сироватки телят (ЕСТ) та експериментальну (вирощування клітин на ростовому середовищі DMEM/F12 без додатків та DMEM/F12 з додаванням 5 % PRP). PRP отримували в результаті двох етапного

центрифугування крові. Мікроскопічний аналіз та фотофіксацію первинних клітинних культур проводили на 1-шу, 3-тю, 7-му добу.

2.5 Методи морфологічного дослідження

Матеріалом для морфологічних та морфометричних досліджень стали фрагменти стегового м'язу, печінки, легені, нирки. Для здійснення гістологічного дослідження матеріал фрагменти фіксували в 10 %-му розчині забуференого нейтрального формаліну. Подальше проведення гістологічних препаратів здійснювалося згідно загальноприйнятих методик. Виготовлення серійних парафінових зрізів товщиною 4-6 мкм. проводилося на санному мікроскопі. Фарбування препаратів здійснювалося гематоксиліном та еозином, за якими вивчали характер морфологічних змін після травми. Для фото документації зображення з гістологічних препаратів виводили на монітор комп'ютера за допомогою мікроскопа Nikon eclipse C та цифрової відеокамери (Digital Camera SCMOS) за допомогою програмного забезпечення TourWiev при різних збільшеннях.

Вивчення гістологічних препаратів проводили у зоні безпосереднього дефекту, у перичентральній ділянці (зона м'язу, що безпосередньо прилягає до місця дефекту) та у прикрайовій ділянці (зона м'язу, що прилягає до неураженої частини органу). При морфометричному аналізі визначали кількість МВ різного типу, площі сполучної тканини, площі їх поперечного перетину, площі регенерації (ПР) та ушкодження (ПУ). Далі проводили поділ МВ на три групи: нормальні м'язові волокна (НМВ), пошкоджені м'язові волокна (ПМВ) та регенеруючі м'язові волокна (РМВ). Статистичний аналіз був проведений із використанням пакету програм SPSS-17. Безперервні дані представлені у вигляді середнього арифметичного (М) та середнього квадратичного відхилення (SD). Величини на нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Колмогорова- Смірнова. Визначення достовірності відмінностей показників морфометричних параметрів між чотирма термінами

експерименту проводили із використанням однофакторного дисперсійного аналізу для повторних вимірів за допомогою методу «узагальненої лінійної моделі» (GLM) з наступними апостеріорним тестом Бонферроні. Відмінність вважали достовірною, якщо значення P не перевищувало 0,05 ($P < 0,05$).

Ідентифікацію колагенових волокон здійснювали за Ван Гізоном.

2.6 Статистична обробка матеріалу

Статистичну обробку матеріалу здійснювали за допомогою персонального комп'ютера та прикладної програми для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel за допомогою пакету «STATISTICA-10 for Windows®-6, 0». Достовірність відміни пари середніх обчислювалась за допомогою критеріїв Ст'юдента та Фішера. Графіки оформлювали за допомогою програм «Microsoft Excel 7.0».

Статистичне опрацювання морфометричного аналізу проводили із використанням пакету програм SPSS-17. Безперервні дані представлені у вигляді середнього арифметичного (M) та середнього квадратичного відхилення (SD). Величини на нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Визначення достовірності відмінностей показників морфометричних параметрів між чотирма термінами експерименту проводили із використанням однофакторного дисперсійного аналізу для повторних вимірів. Останній був реалізований за допомогою методу «узагальненої лінійної моделі» (GLM) з наступними апостеріорним тестом Бонферроні. Відмінність вважали достовірною, якщо значення P не перевищувало 0,05 ($P < 0,05$).

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VITRO ВПЛИВУ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ КРОВІ НА ПРОЦЕСИ РЕГЕНЕРАЦІЇ

Метою даного розділу було вивчення порівняно впливу PRP на клітинну проліферацію таких клітинних ліній щурів як МСК із пуповинного канатика, МСК із м'язів плода та фібробласти шкіри. Проліферативна активність МСК з пуповинних канатиків, м'язів плода та фібробластів залежала від типу первинного матеріалу та складу культурального середовища. Для експерименту було закладено культуральні флакони (25 см²). В кожен з них було внесено по 250 000 клітин, розчинених у DMEMр. Клітини у флаконах залишили на добу в CO₂-інкубаторі для прикріплення та розпластування клітин. Через 24 год було замінено середовище в усіх флаконах. Дизайн експерименту включав контрольну групу – з додаванням 5 % ембріональної сироватки телят (ЕСТ) та експериментальні (вирощування клітин на ростовому середовищі DMEM/F12 без додатків та DMEM/F12 з додаванням 5 % PRP). PRP отримували в результаті двох етапного центрифугування крові.

Мікроскопічний аналіз первинних клітинних культур провели через 24 год інкубування. Встановлено, що щільність клітин МСК пуповини становила в середовищі з 5 % PRP – 30 %, в середовищі без факторів росту – 5 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 40 %, а щільність клітин МСК м'язової тканини – в середовищі з 5 % PRP – 45 %, в середовищі без факторів росту – 50 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 50 %, щільність клітин фібробластів шкіри – в середовищі з 5 % PRP – 45 %, а в середовищі без факторів росту – 40 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 40 %, (табл.3.1, рис. 3.1).

МСК пуповини та міогенні клітини досягли максимальної щільності клітинної популяції у контролі, а у варіанті з PRP конфлюент був статистично-достовірно слабшим у флаконах зі стовбуровими клітинами пуповини (табл. 3.1, рис. 3.1).

Таблиця 3.1 – Вплив сироватки та різних фракцій плазми крові щурів на щільність клітинних популяцій у різні терміни експерименту

Варіанти	МСК пуповини (конфлюент, %)			МСК м'язової тканини (конфлюент, %)			Фібробласти шкіри (конфлюент, %)		
	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба
Контроль+ 5 % ЕСТ	40 ± 3	85 ± 7	100	50 ± 5	85 ± 5	100	40 ± 4	60 ± 5	45 ± 3
DMEM F12 середовищ без факторів росту	5 ± 1	2 ± 1	відмерли	50 ± 5	75 ± 7	90 ± 6	40 ± 3	45 ± 5	12 ± 3
5 %PRP	30 ± 3	65 ± 5	75 ± 7	45 ± 5	80 ± 5	90 ± 7	45 ± 6	80 ± 7	100

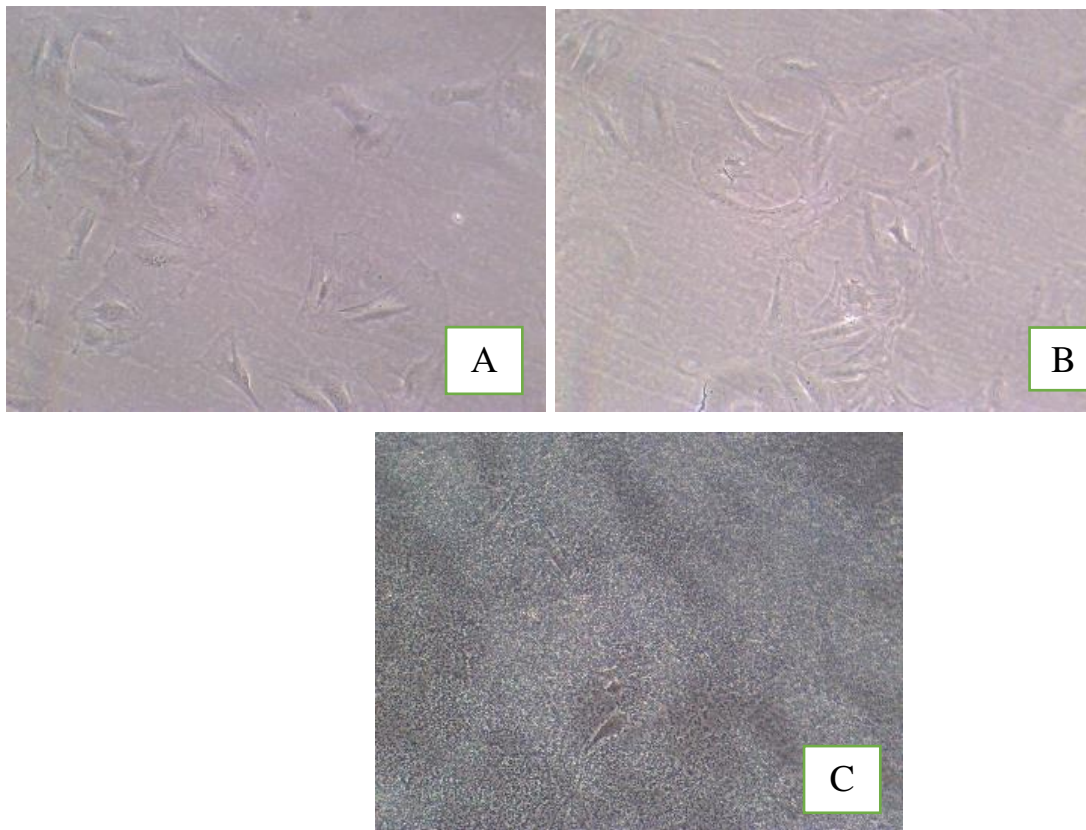


Рисунок 3.1 – МСК із м'язової тканини (аналіз на 1-шу добу): (а) – середовище без факторів росту; (b) – контроль (5 % ЕСТ); (c) – PRP

Відповідно до даних таблиці 3.1 на третю добу щільність клітин МСК пуповини становила в середовищі з 5 % PRP – 65 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 85 %, а в середовищі без факторів росту – 2 %, МСК м'язової тканини – в середовищі з 5 % PRP – 80 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 85 %, а в середовищі без факторів росту – 75 % (рис. 3.2). Конфлюент фібробластів шкіри становив в середовищі з 5 % PRP – 80 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 60 %, а в середовищі без факторів росту – 45 % (табл. 3.1).

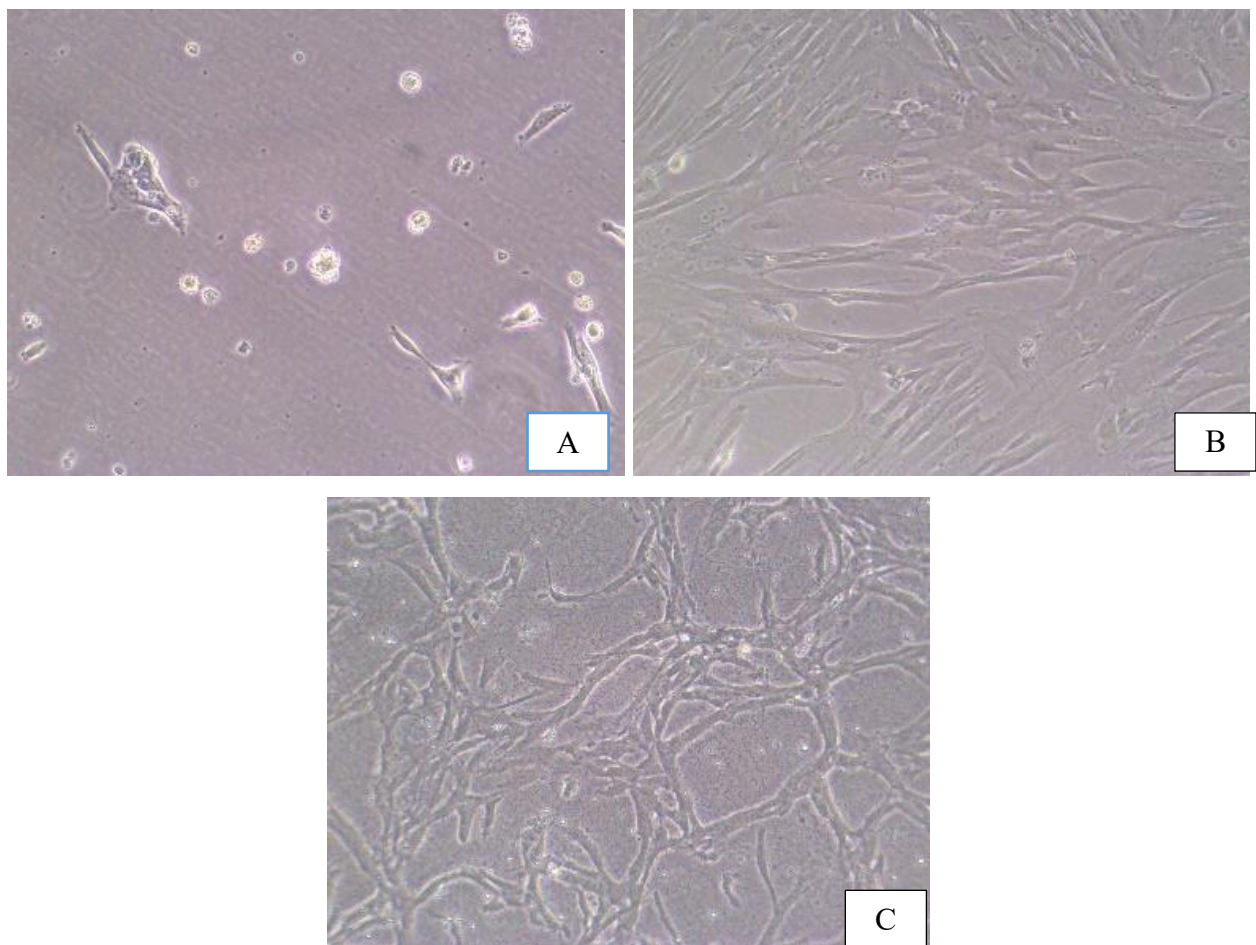


Рисунок 3.2 – МСК із м'язової тканини (аналіз на 3 добу): (а) – середовище без факторів росту; (b) – контроль (5 % ЕСТ); (c) – PRP

Аналізуючи отримані дані на сьому добу експерименту встановлено, що щільність клітин МСК пуповини становила в середовищі з 5 % PRP – 75 %, у варіанті з 5 % ЕСТ – 100 % (рис 3.3), та в групі без факторів росту клітини були відмерлі. Конфлюент МСК м'язової тканини склав в середовищі з 5 % PRP –

90 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 100 %, а в середовищі без факторів росту – 90 % (рис 3.4). Конфлюент фібробласти шкіри склав в середовищі з 5 % PRP – 100 %, в середовищі з 5 % ЕСТ – 45 %, а в середовищі без факторів росту – 12 % (див. табл. 3.1).

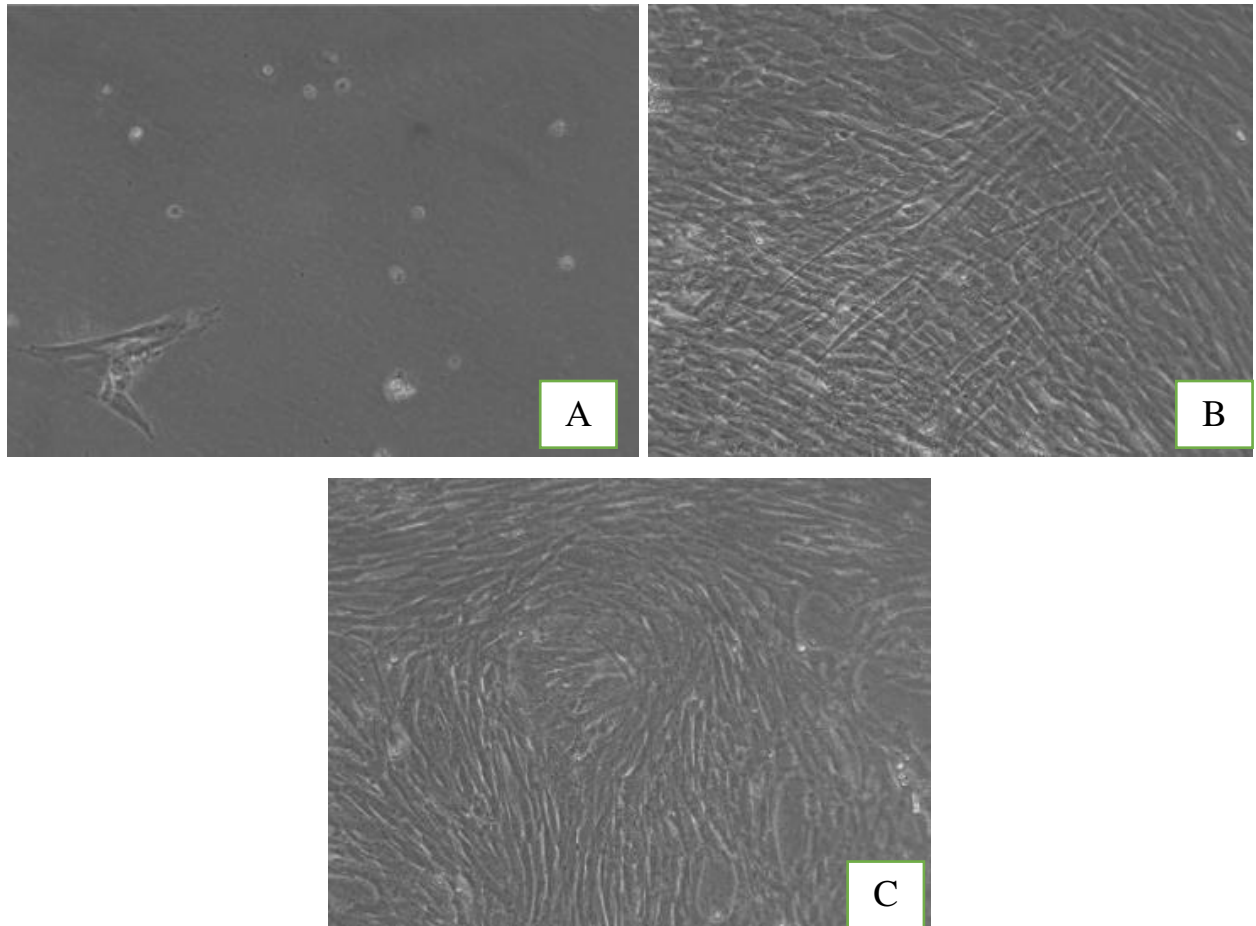


Рисунок 3.3 – МСК із пуповинного канатика (аналіз на 7-му добу): (а) – середовище без факторів росту; (b) – контроль (5 % ЕСТ); (с) – PRP

Додавання PRP до МСК скелетних м'язів мало подібний стимулюючий ефект до ЕСТ (див. табл. 3.1, рис. 3.4).

Найчутливішими до стимулюючої дії PRP виявились фібробласти шкіри. Ця клітинна лінія мала слабший проліферативний потенціал, ніж міогенні стовбурові клітини і тому потребувала стимуляції додатками до поживного середовища ЕСТ чи фракцій плазми крові. На 7-й день експерименту у середовищі без факторів росту конфлюент складав біля 10 %, у контролі лише

45 %, тоді як у варіанті PRP щільність клітинної популяції досягнула 100 % моношару (див. табл. 3.1, рис. 3.5). Тому, можна припустити, що в регенеративній медицині використання PRP є перспективним.

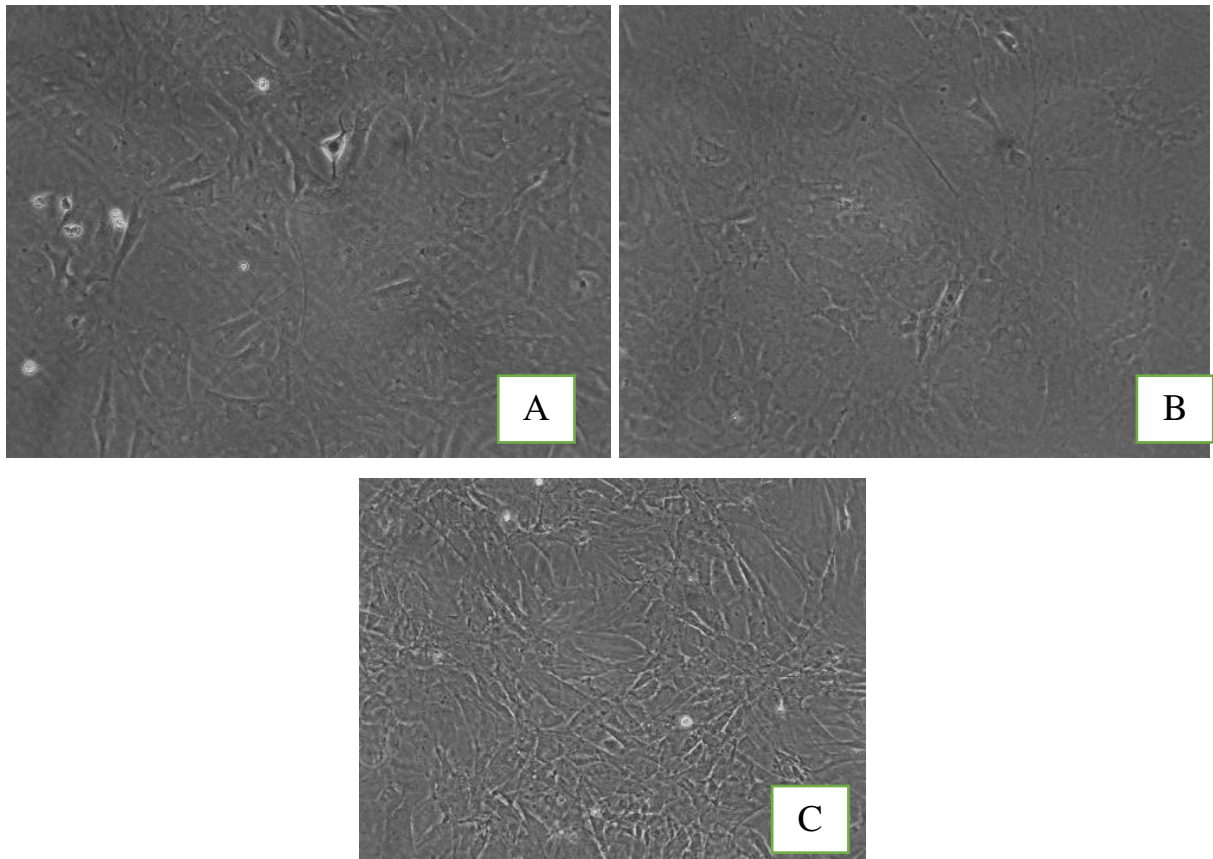


Рисунок 3.4 – Міогенні клітини плода (аналіз на 7-му добу): (а) – середовище без факторів росту; (b) – контроль (5 % ЕСТ); (c) – PRP

Мікроскопічний аналіз стану клітинних культур у різні терміни експерименту показав, що найбільш чутливими до додатків сироватки чи плазми виявились МСК пуповини, оскільки у варіанті без факторів росту ріст цих клітин був дуже сповільненим, а за тиждень експерименту такі клітини відмерли. Помірну чутливість до стимулюючої дії біологічно-активних компонентів сироватки крові проявляли фібробласти шкіри. Найменш залежними від додатків до поживного середовища виявились міогенні клітини – вони зберігали свою високу проліферативну активність навіть за відсутності ЕСТ чи плазми крові.

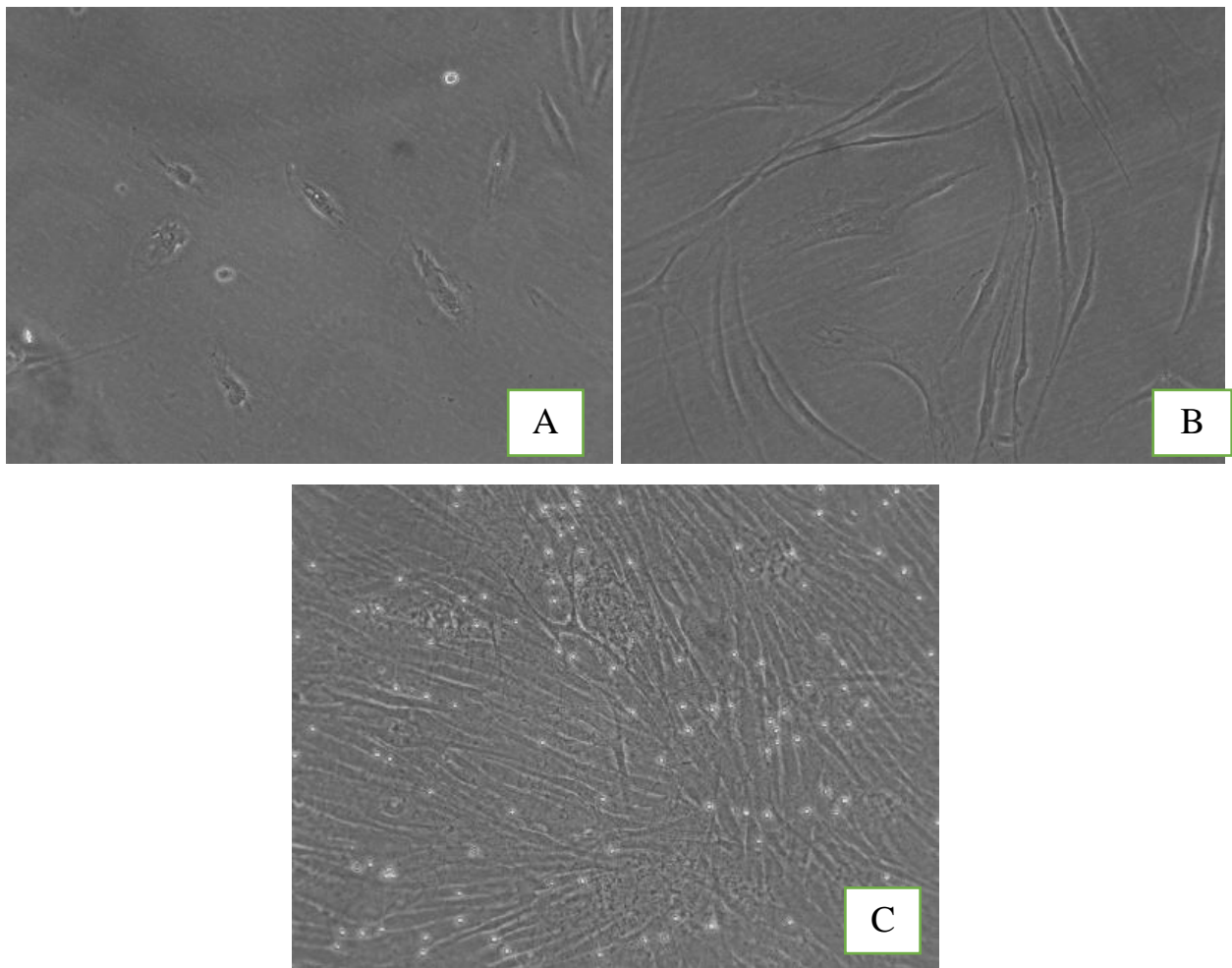


Рисунок 3.5 – Фібробласти шкіри плода (аналіз на 7-му добу): (а) – середовище без факторів росту; (b) – контроль (5 % ECT); (c) – PRP

На основі наведених у розділі 3 результатів можна зробити такі проміжні висновки:

1. Проліферативна активність МСК із пуповинного канатика, МСК із м'язів плода та фібробластів шкіри щурів залежала від типу первинного матеріалу та складу культурального середовища. Найвища проліферативна активність МСК щурів характерна для клітин м'язів.

2. Проведене нами дослідження показало, що плазма, збагачена тромбоцитами у вигляді 5 % добавки до ростового середовища має виражену стимулюючу дію на проліферативну активність фібробластів, але менш ефективна у випадку клітинної культури мезенхімальних стовбурових клітин.

3. Міогенні клітини щурів володіють високим проліферативним потенціалом і не потребують додаткової стимуляції PRP у досліджених нами концентраціях.

Наведені в розділі результати опубліковано у наукових працях автора [17, 35, 139].

РОЗДІЛ 4

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ М'ЯЗІВ ДІЛЯНКИ ПОШКОДЖЕННЯ, ЛЕГЕНІВ, ПЕЧІНКИ, НИРОК ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ТРАВМАТИЧНОГО УШКОДЖЕННЯ М'ЯЗІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ КРОВІ ТА МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ У РАННЬОМУ ТА ПІЗНЬОМУ ПОСТТРАВМАТИЧНОМУ ПЕРІОДАХ

4.1 Гістологічні та морфометричні зміни м'язів у ранньому посттравматичному періоді та за корекції збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальними стовбуровими клітинами

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 1-шу добу в ділянці пошкодження було виявлено гострі розлади кровообігу з вогнищевим руйнуванням судин, зруйновані м'язи, просочені еритроцитами, набряк оточуючих волокон, тканинні детрити, незначну кількість лімфо– та гістіоцитів, тучних клітини, поодинокі сегментоядерні лейкоцити та значну кількість фібрину (рис. 4.1).

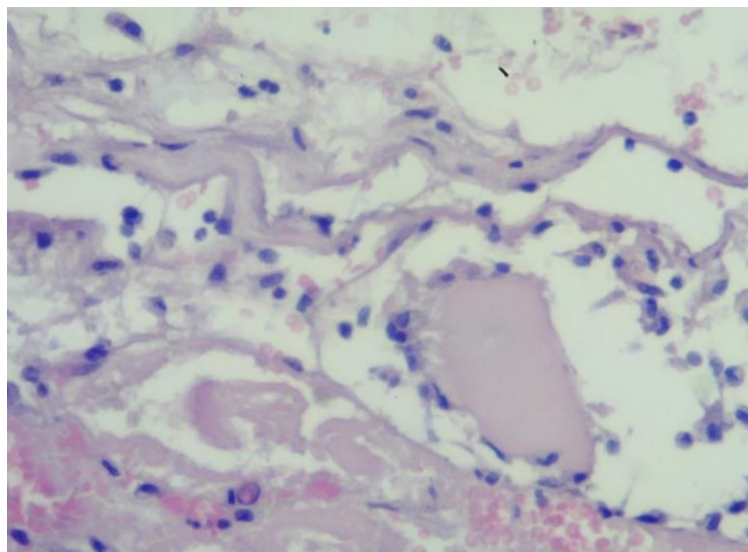


Рисунок 4.1 – М'язи ділянки пошкодження на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Зруйновані м'язи, тканинні детрити. Збарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

З метою визначення кількісного показника неушкоджених, ушкоджених та регенеруючих м'язових волокон ділянки травмування у групі без корекції, при корекції PRP та МСК був проведений морфометричний аналіз (табл. 4.1).

Провівши морфометричний аналіз м'язових волокон на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язу встановили, що площа неушкоджених м'язів становила $(30,93 \pm 0,7)$ мкм², а ушкоджена тканина переважала та складала $(100,4 \pm 22,8)$ мкм².

Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження показало, що при травматичному ушкодженні м'язів в м'язових структурах переважали явища набряку та пошкодження тканини. Місцями навколо м'язів спостерігались фрагменти колагенових волокон із ознаками мукоїдного набряку, дещо хаотичного ходу фібрил, серед яких визначались еритроцити, лімфоцити та лейкоцити (рис. 4.2).

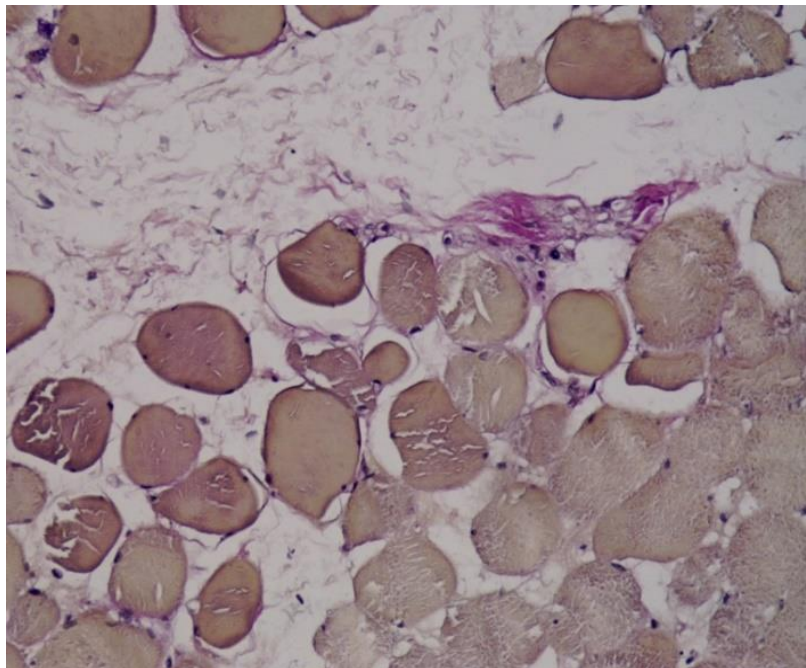


Рисунок 4.2 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Виражений набряк.

Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

Таблиця 4.1 – Морфометричний аналіз м'язів щурів ділянки пошкодження та при корекції PRP та МСК у ранній посттравматичний період

	Площа неушкоджених м'язових волокон			Площа ушкоджених м'язових волокон			Площа регенеруючих м'язових волокон		
	1-ша Група	2-га група	3-тя група	1-ша група	2-га група	3-тя група	1-ша група	2-га група	3-тя група
1 доба	30,93 ± 0,7	22,8 ± 0,6	22,4 ± 1,4	100,4 ± 22,8	90,87 ± 2,0	91,4 ± 6,1	-	-	-
7 доба	60,7 ± ,2	78,1 ± 1,9	70,4 ± 5,0	170,3 ± 21,4	160,3 ± 6,8	125,0 ± 12,5	32,53 ± 2,1	43,47 ± 2,6	35,0 ± 4,1
	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001

Примітка. Результати представлені у вигляді $M \pm SD$. P – відображає достовірність відмінностей показників між усіма термінами експерименту (відповідно до методу узагальненої лінійної моделі); * – вказує на наявність достовірної відмінності показників між вказаним терміном експерименту (відповідно до апостеріорного тесту Бонферроні).

На першу добу в другій групі при застосуванні PRP на моделі травматичного ушкодження м'язів було виявлено в ділянці пошкодження розширення та повнокров'я судин, гостру запальну реакцію навколо судинної стінки, проте значний периваскулярний набряк строми не візуалізувався. В пошкоджених м'язах візуалізувались некротичні зміни (рис. 4.3).

Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів була незначною і становила $(22,8 \pm 0,6)$ мкм²; кількість ушкоджених м'язових волокон переважала і становила $(90,87 \pm 6,8)$ мкм² (див. табл. 4.1). Це на 10 % менше, ніж у тварин, яким не проводилась корекція.

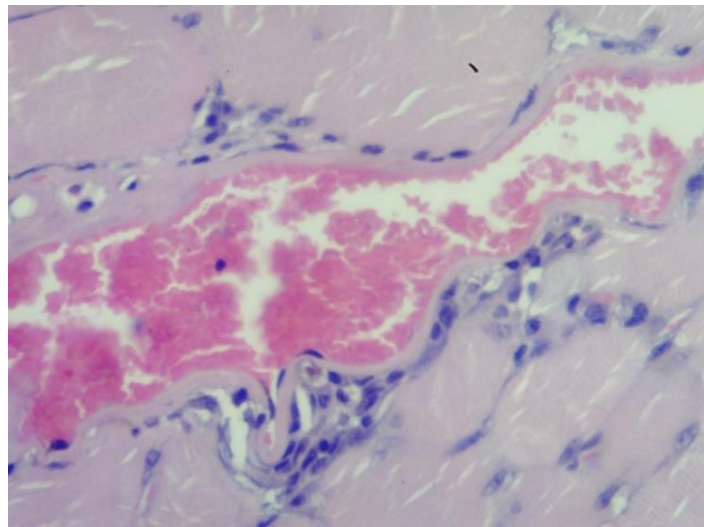


Рисунок 4.3 – Структура м'язів в ділянці пошкодження на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при застосуванні PRP.

Помірна периваскулярна запальна реакція. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження м'язів на фоні корекції PRP встановило, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів візуалізувався виражений набряк строми, насичений мізерними фракціями колагенових волокон, які розташовувались переважно хаотично (рис. 4.4).

Застосування МСК на моделі травматичного ушкодження м'язів на 1-шу добу в ділянці травмування було виявлено переважно повнокров'я судин у

поєднанні із гострою запальною реакцією навколо судинної стінки, у поєднанні із периваскулярним набряком. Візуалізувались некротично змінені міоцити (рис. 4.5).

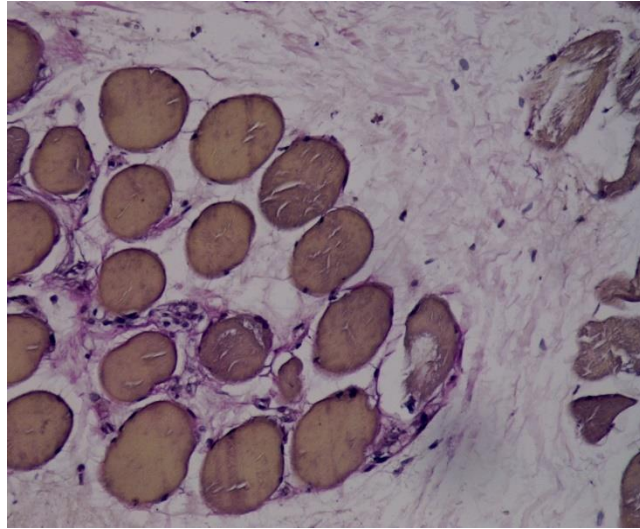


Рисунок 4.4 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів та корекції PRP. Виразений набряк ділянки пошкодження, незначна кількість колагенових волокон. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

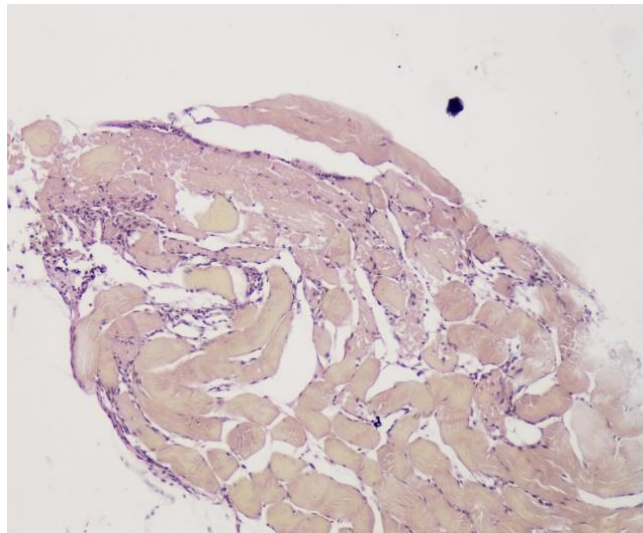


Рисунок 4.5 – Структура м'язів в ділянці пошкодження на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при застосуванні МСК. Помірна лейкоцитарна інфільтрація. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Морфометрично виявлено, що площа неушкоджених м'язів практично не відрізнялась від групи досліджень при корекції PRP і становила $(22,4 \pm 1,4)$ мкм², площа ушкоджених м'язових волокон дещо переважала і становила $(91,4 \pm 6,1)$ мкм² (див. табл. 4.1). Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт (рис. 4.6) вказувало на збільшення колагенових волокон, структура яких була переважно хаотичною.

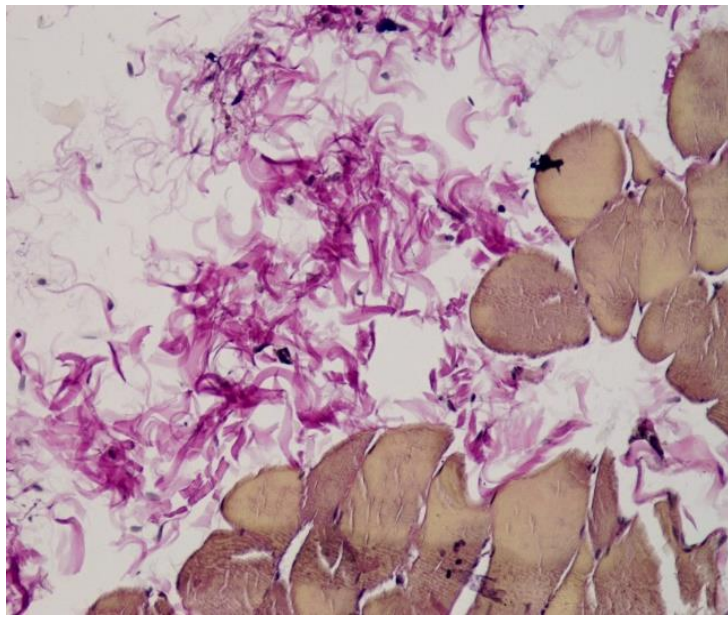


Рисунок 4.6 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. набряк стромі ділянки пошкодження, некротичні зміни в м'язах. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 7-му добу у тварин, без корекції, в ділянці пошкодження виявлялись м'язові волокна із фрагментами деструкції у вигляді аморфних мас, окремі із формуванням контрактур. Ядра слабо візуалізувались або були відсутніми. Поміж м'язовими волокнами зустрічались поодинокі клітини фібробластичного ряду та макрофаги (рис. 4.7). В зоні формування грануляцій також збільшувалась кількість фібробластів.

Морфометричний аналіз ділянки ушкодження на 7-му добу експерименту показав, що площа неушкоджених м'язів дещо зростала до показника $(60,7 \pm 4,9)$ мкм², при цьому і площа ушкоджених м'язових волокон також збільшувалась до $(70,0 \pm 21,4)$ мкм², що складало 65 % порівняно із аналогічною групою на 1-шу добу. В цей період візуалізувались ділянки регенерації, площа яких становила $(32,53 \pm 2,1)$ мкм² (табл. 4.1).

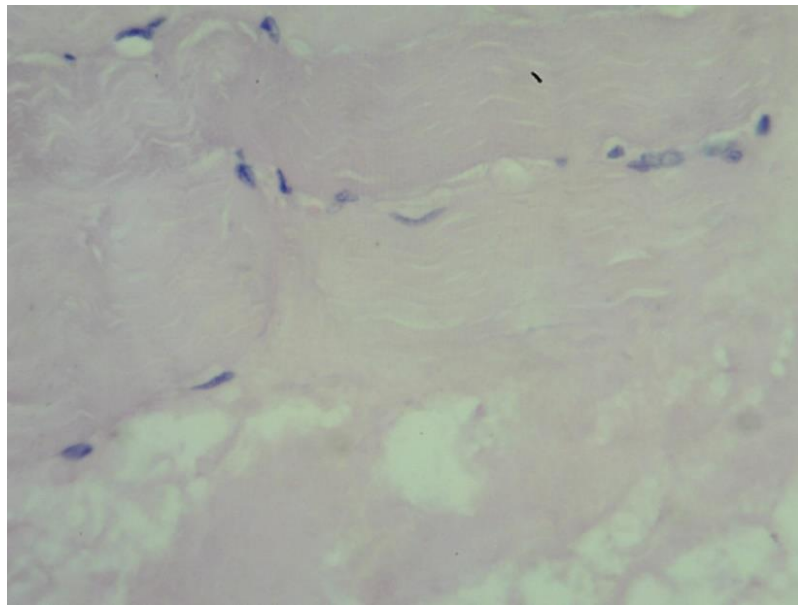


Рисунок 4.7 – Структура м'язів тварини в ділянці пошкодження на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів. Виражені дистрофічні та некротичні зміни. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження показало, що переважно колагенові волокна реструктуровані, розташовані хаотично із вираженим набряком із порушенням ходу та фрагменти пухкої сполучної тканини, серед яких судини мікроциркуляторного русла (рис. 4.8).

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 7-му добу із застосуванням PRP в ділянці пошкодження значна частина м'язових волокон залишались збереженою, про що свідчить наявність ядер та стан саркоплазми. Проте локація окремих була дещо зміненою. Поряд із цим спостерігались

помірні дистрофічні зміни у досліджуваних структурах. Волокна оточені значною частиною колагену із ознаками набряку (рис. 4.9).

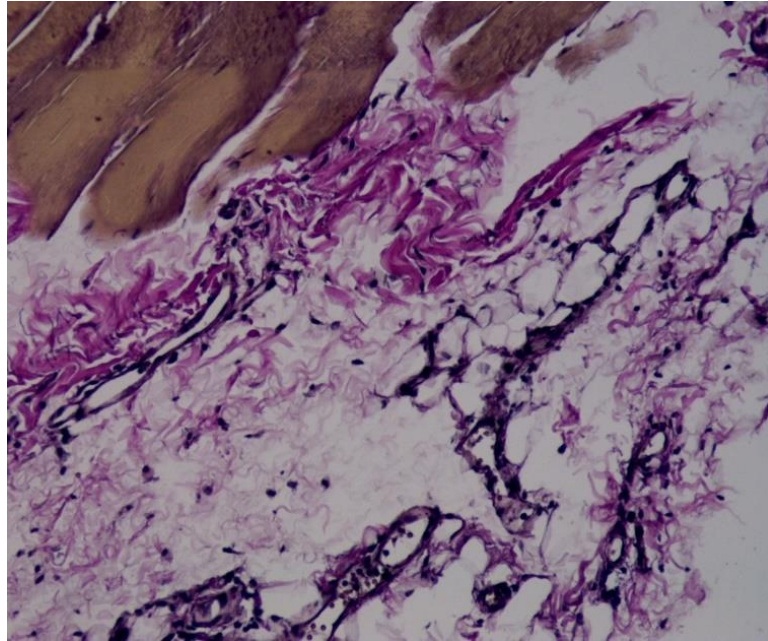


Рисунок 4.8 – Ділянка пошкодження на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів. Хаотично розташовані колагенові волокна із вираженим набряком. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

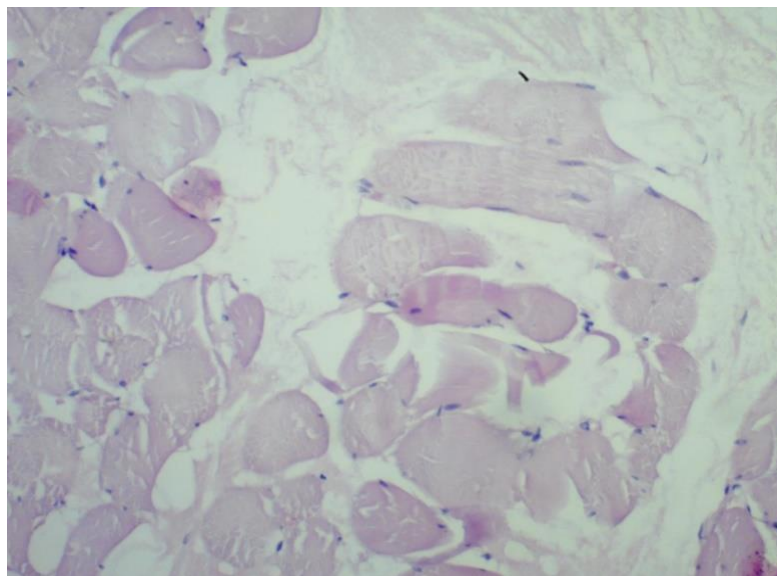


Рисунок 4.9 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 7-му добу травматичного ушкодження м'язів та корекції PRP. Частково збережені м'язові волокна, формування рубця. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів становила $(78,1 \pm 1,9)$ мкм², що на 23 % перевищує показник групи досліджень без корекції (табл. 4.2). Порівняно з попередньою групою є дещо меншою і площа пошкоджених м'язових волокон, яка становить $(160,0 \pm 10,2)$ мкм², що свідчить про зменшення впливу пошкоджуючого фактора і становить 6 %.

Мало місце зростання регенерації волокон на 26 % порівняно із тваринами, у яких не проводилась корекція (табл. 4.2; рис. 4.10).

При гістохімічному дослідженні ділянки пошкодження м'язових волокон у зоні формування грануляційної тканини було виявлено накопичення колагенових волокон та незначної кількості еластичних волокон (рис. 4.10) у другій групі.

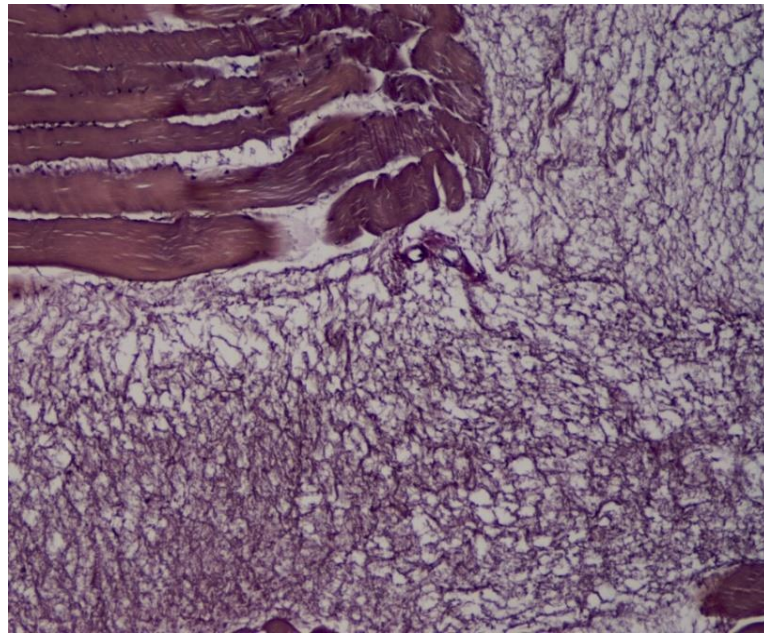


Рисунок 4.10 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 7-му добу травматичного ушкодження м'язів та корекції PRP. Значна частина колагенових волокон в ділянці ушкодження. Зabarвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 100$

На 7-му добу під впливом МСК в ділянці ушкодження візуалізувалась помірна гіперемія судин, дещо зменшення периваскулярного набряку, незначні дистрофічні прояви в м'язових волокнах (рис. 4.11). У досліджуваній тканині виявлено незначне поширення набряку по стромальних компонентах із ураженням периневральної строми.

Таблиця 4.2 – Морфометричний аналіз м'язів щурів ділянки пошкодження та при корекції PRP та МСК у пізній посттравматичний період

Термін спостереження	Площа неушкоджених м'язових волокон			Площа ушкоджених м'язових волокон			Площа регенеруючих м'язових волокон		
	1-ша група	2-га група	3-тя група	1-ша група	2-га група	3-тя група	1-ша група	2-га група	3-тя група
14-та доба	84,7 ± 9,0	136,6 ± 9,4*	110,0 ± 9,8*	138,0 ± 26,8	120,0 ± 9,4*	135,0 ± 20,1	85,0 ± 2,1	54,0 ± 3,4*	55,0 ± 7,0*
21-ша доба	91,0 ± 4,2	115,0 ± 3,0*	110,0 ± 3,0	54,0 ± 3,3	30,0 ± 0,9*	36,0 ± 4,0	39,0 ± 2,5	24,0 ± 2,1	20,0 ± 1,7
	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001	P≤0,001

Примітка. Результати представлені у вигляді M ± SD. P – відображає достовірність відмінностей показників між усіма термінами експерименту (відповідно до методу узагальненої лінійної моделі); * – вказує на наявність достовірної відмінності показників між вказаним терміном експерименту (відповідно до апостеріорного тесту Бонферроні).

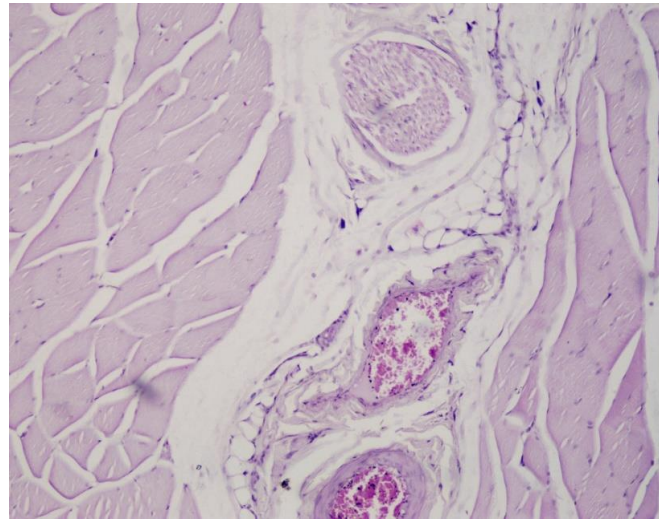


Рисунок 4.11 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 7-му добу травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. Виражена гіперемія та повнокров'я судин в ділянці ушкодження, набряк стромы. Забарвлення гематоксиліном та еозином $\times 100$

Застосування МСК показало збільшення неушкоджених волокон в ділянці травми на 15 % ($70,4 \pm 9,7$) мкм^2 (табл. 4.2), збільшення площі ушкоджених м'язових волокон на 26 % ($125,3 \pm 12,5$) мкм^2 та збільшення площі регенеруючих волокон на 9 % ($35,5 \pm 4,1$) мкм^2 (табл. 4.2), (рис. 4.12).

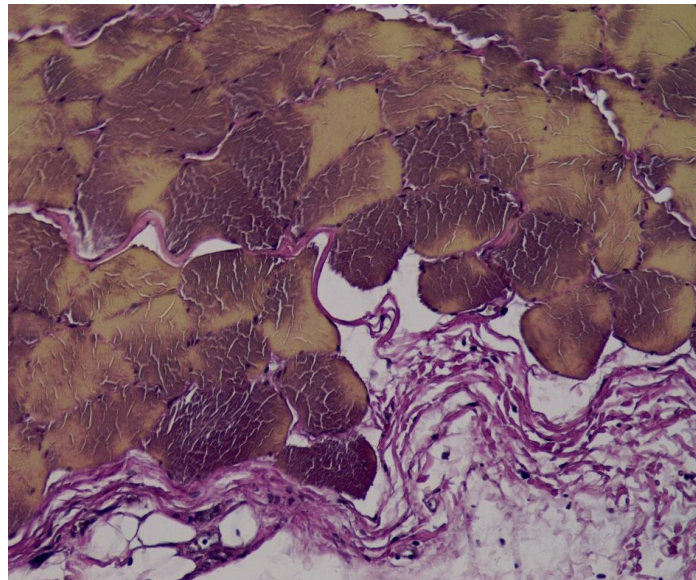


Рисунок 4.12 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 7-му добу травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. Помірне збільшення колагенових волокон в ділянці ушкодження, різні прояви в м'язових волокнах. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 100$

4.2 Гістологічні та морфометричні зміни м'язів у пізньому посттравматичному періоді й за корекції збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальними стовбуровими клітинами

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 14-ту добу в ділянці пошкодження візуалізувалась сформована колагенова строма з помірним набряком, насичена клітинами як фібробластичного ряду так і лімфоцитами та плазмоцитами. В частини м'язових волокон спостерігались прояви білкової дистрофії, проте некротичні зміни були значно меншими (рис. 4.13). Інтенсивність сприйняття барвників саркоплазмою зростала. Морфометричний аналіз показав, що площа неушкоджених волокон збільшувалась порівняно із 7-ою добою і становила $(138,0 \pm 26,8)$ мкм². Збільшувалась також площа регенеруючих м'язових волокон до $(84,7 \pm 9,0)$ мкм².

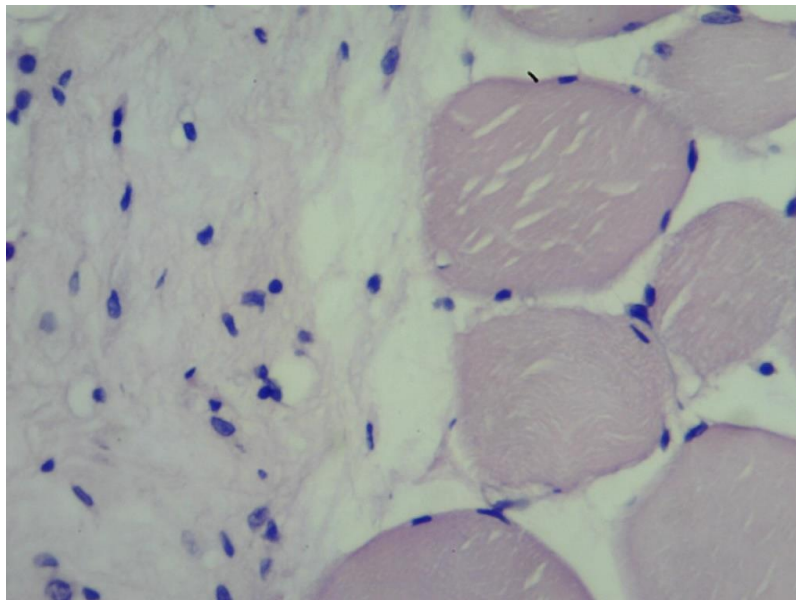


Рисунок 4.13 – М'язи тварини ділянки пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Колагенова строма з помірним набряком.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Гістохімічне дослідження ділянки травматичного пошкодження м'язових волокон візуалізуються переважно колагенові волокна із ознаками значного набряку. Незначна частина м'язових структур із дистрофічно-некротичними змінами, частина волокон із проявами посиленої регенерації (рис. 4.14).

Корекція PRP у тварин другої групи значно збільшувала площа неушкоджених волокон на 39 % ($136,6 \pm 9,4$) мкм², зменшувало кількість ушкоджених волокон на 14 % та незначно впливало на регенераторну активність ($54,0 \pm 3,4$) мкм² (див. табл. 4.2).

Наші дослідження показали, що застосування МСК сприяє збільшенню площі неушкоджених волокон на 24 %, проте у меншій мірі, ніж PRP; кількість ушкоджених м'язових волокон зменшувалась лише на 3 % порівняно із групою контролю, а площі регенеруючих волокон майже не відрізнялась від показника тварин із застосуванням PRP і становила ($55,0 \pm 7,0$) мкм² (табл. 4.2; (рис. 4.18, 4.19).

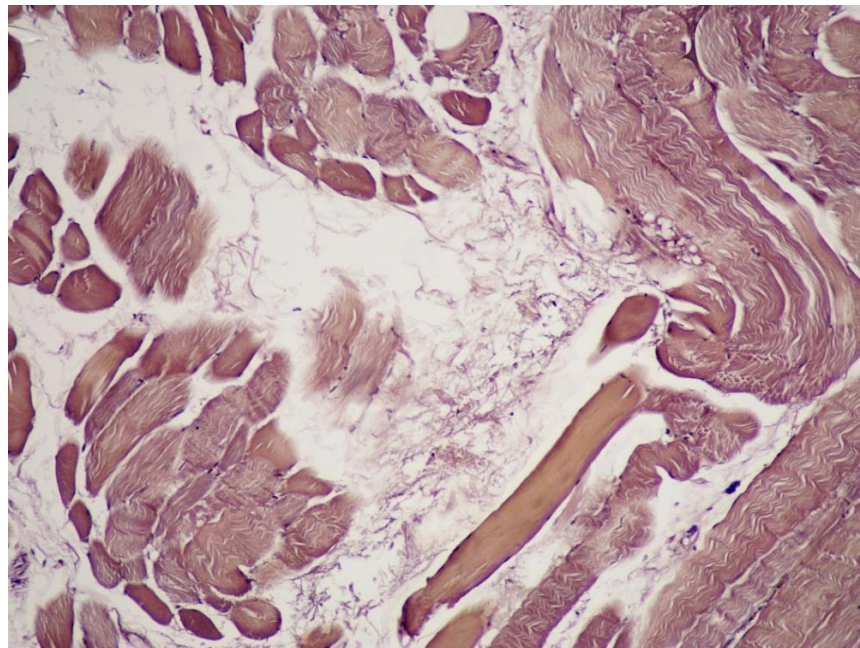


Рисунок 4.14 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Виразений набряк колагенових волокон, поодинокі м'язові структури із ознаками некрозу, ділянки регенерації.

Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 100$

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 14-ту добу та проведення корекції PRP в ділянці пошкодження візуалізувалось зменшення площі колагенової стромы, виражене зменшення набряку, значної площі клітин фібробластичного ряду та формування нових судин мікроциркуляторного русла. В окремих м'язових волокнах подекуди спостерігались прояви білкової дистрофії, проте некротичні зміни практично не візуалізувались (рис. 4.15).

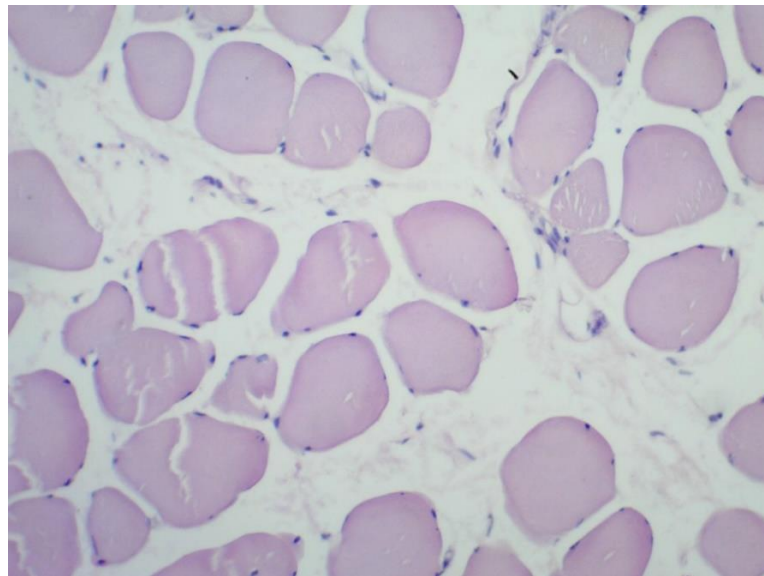


Рисунок 4.15 – М'язи тварини ділянки пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Виражене відновлення м'язових структур. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження встановило на 14-ту добу експерименту значно зростала кількість регенеруючих м'язових волокон у тварин без проведення корекції. Такі прояви очевидно підтверджують значний відсоток ушкоджених м'язових волокон під час експерименту (рис. 4.16).

При застосуванні PRP добре візуалізуються колагенові та еластичні волокна, пухка сполучна тканина (рис. 4.17). Еластичні волокна більш сформовані навколо судин та в навколо м'язовій стромі.

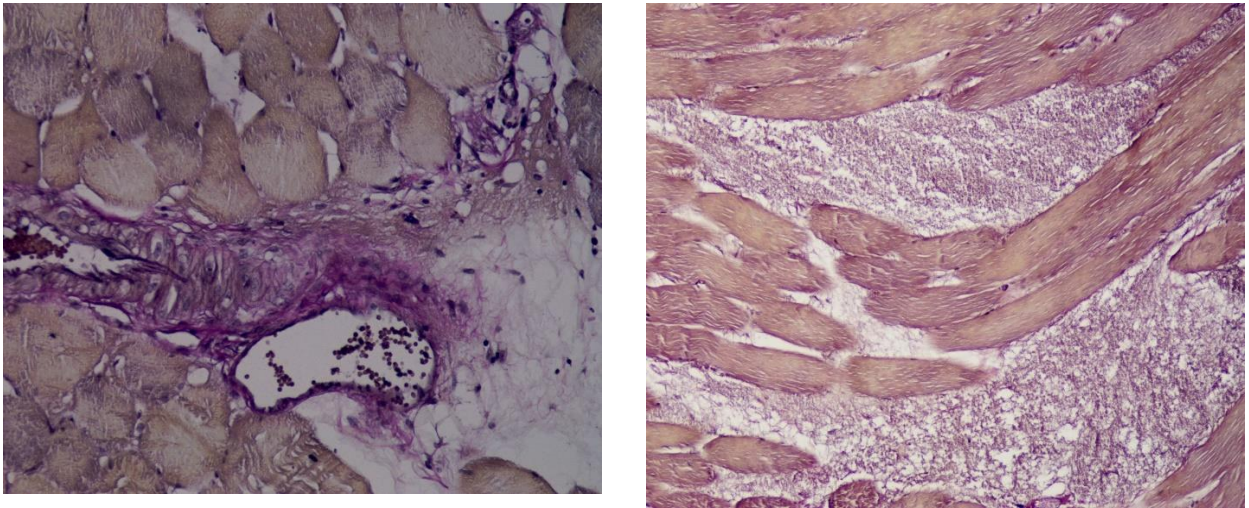


Рисунок 4.16 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Колагенові та еластичні волокна. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 100$

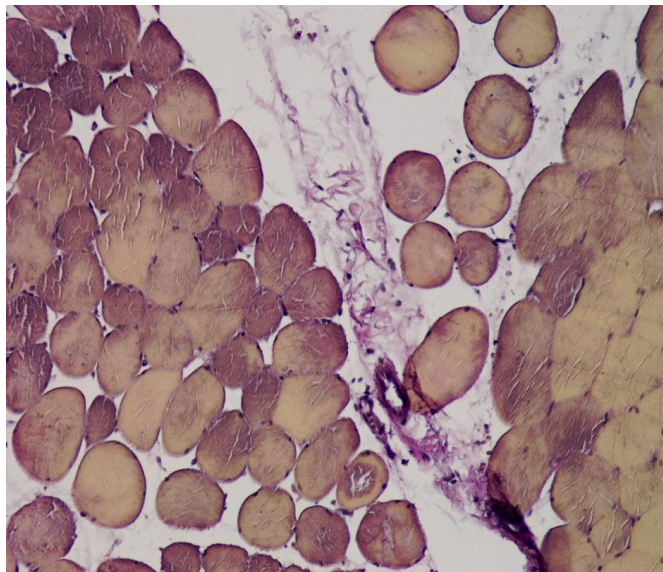


Рисунок 4.17 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Збільшення площі регенеруючих м'язових волокон. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

У порівнянні із групою досліджень, яким застосовували корекцію МСК в ділянці травми визначалась значна частина волокон із проявами білкової дистрофії (рис. 4.18). Поряд із цим, значно зменшувався периваскулярний набряк, проте залишались його прояви навколо волокон.

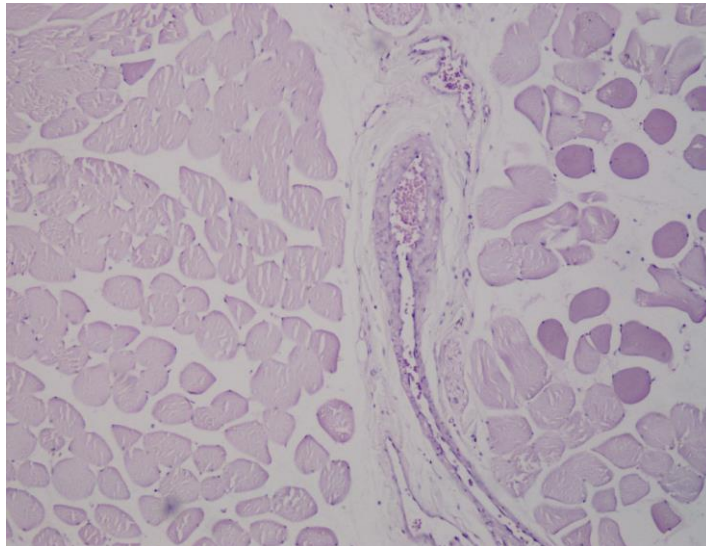


Рисунок 4.18 – М'язи тварини ділянки пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Виражене відновлення м'язових структур. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Гістохімічне дослідження тканини ділянки пошкодження встановило на 14-ту добу експерименту в групі де корекція проводилась МСК візуалізувалось потовщення колагенових волокон, їх хаотичне розташування (рис. 4.19).

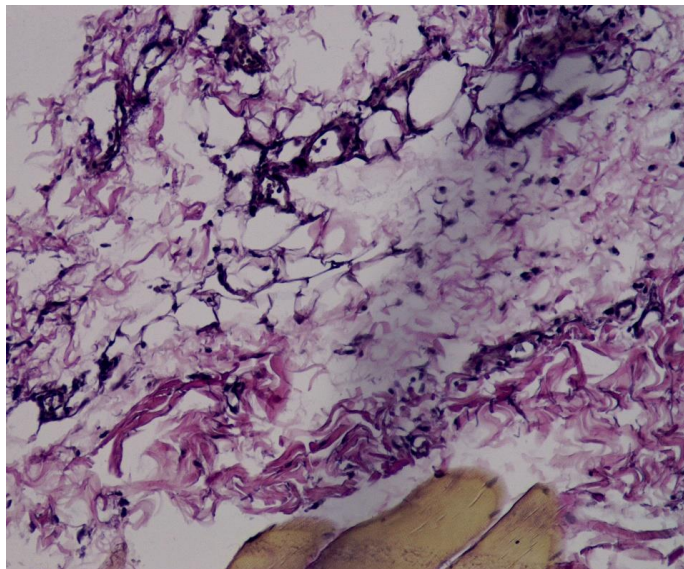


Рисунок 4.19 – Ділянка пошкодження на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Потовщення колагенових волокон. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

Моделювання травматичного ушкодження м'язів на 21-шу добу показало, що в ділянці пошкодження візуалізувалось зменшення площі загальної клітинної інфільтрації, формування капілярної сітки в грануляційній тканині, дрібновогнищеву перивакулярну лімфо-плазмоцитарну інфільтрацію. Візуально зменшувалась кількість фібробластів та тучних клітин. Проте помірний вогнищевий периваскулярний набряк переважав у ділянках проекції м'язових волокон. Інтенсивність сприйняття саркоплазмовою барвників не зростала (рис. 4.20).

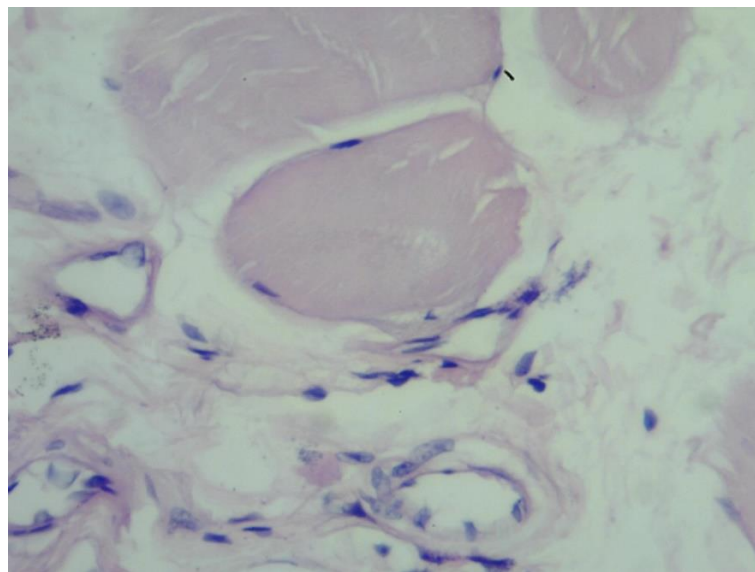


Рисунок 4.20 – М'язи тварини ділянки пошкодження на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Формування капілярної сітки, збільшення клітин фібробластичного ряду. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів на 21-шу добу експерименту становила $(91,0 \pm 6,4)$ мкм², що на 8 % відрізняється від показника на 14-ту добу дослідження. Серед них візуалізуються частина волокон із різними ознаками пошкодження, що становить $(54,0 \pm 1,9)$ мкм² їх площі (див. табл. 4.2). Разом із тим зменшувалась площа регенеруючих волокон, очевидно що в цей посттравматичний період структурні зміни у м'язових волокнах уже відбулись $(39,0 \pm 2,5)$ мкм² (табл. 4.2).

Гістохімічний аналіз ділянки пошкодження встановив, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів добре візуалізуються колагенові та еластичні

волокна (рис. 4.21), які ставали більш структурованими, компактними; зменшувалась площа ділянки пошкодження. Проте все ще залишався виражений набряк строми, який поширювався по ходу волокон та в міжм'язовому інтерстиції.

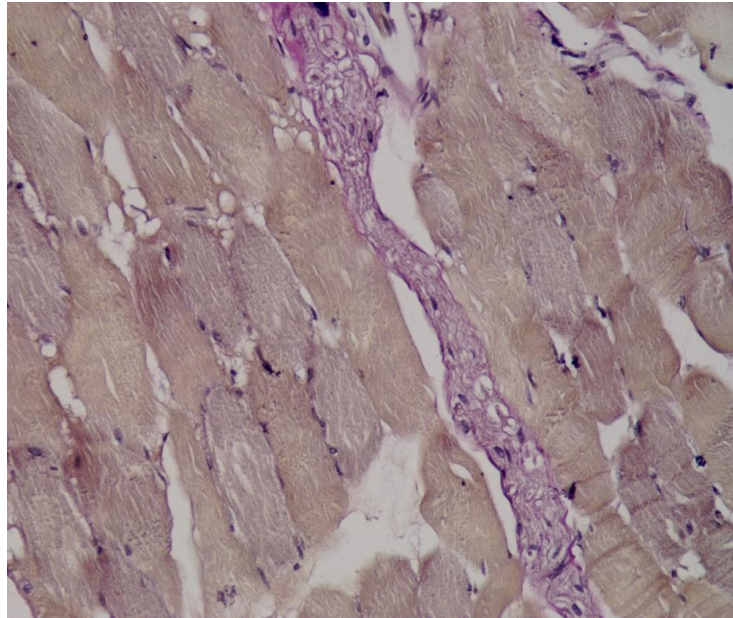
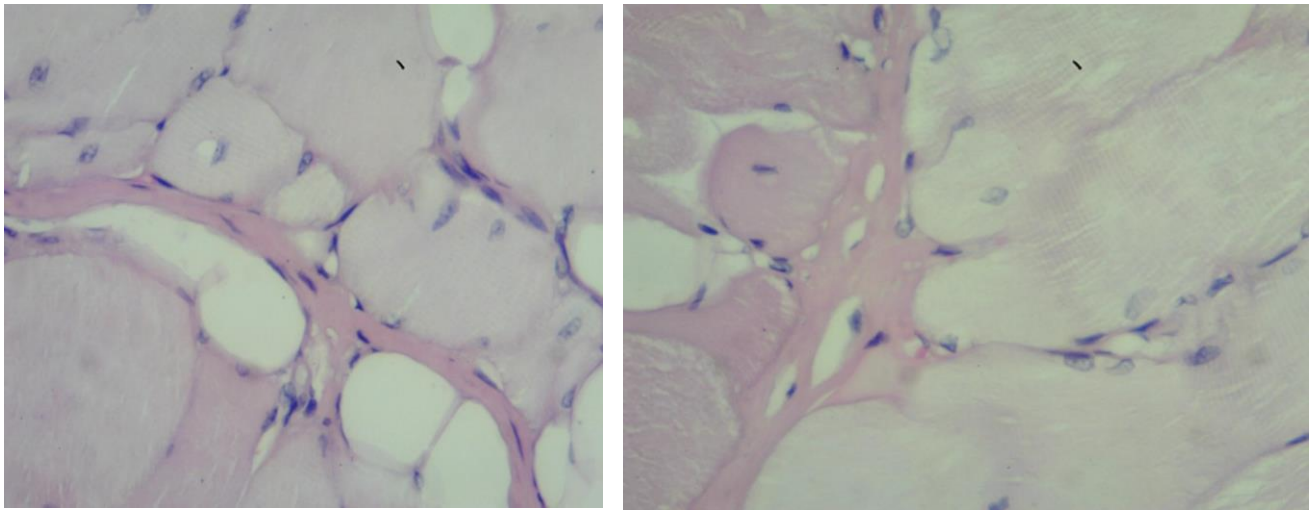


Рисунок 4.21 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Колагенові та еластичні волокна, помірний набряк, поодинокі грануляції. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 100$.

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 21-шу добу з корекцією PRP в ділянці пошкодження пухкі колагенові волокна заміщувались гіалінізованою стромою. Різко зменшувалась кількість лімфо- та плазмоцитів, фібробластів, тучних клітин та практично зникав периваскулярний набряк. Чітко збереженими візуалізувались судини мікроциркуляторного русла. Покращувалась структура самих м'язових волокон: саркоплазма інтенсивніше сприймала барвники, ядра відновлювали свою локалізацію (рис. 4.22).

Морфометричний аналіз показав достовірні показники посилення регенерації м'язових волокон при застосуванні PRP, які становили $(24,0 \pm 0,7)$ мкм^2 при застосуванні PRP. Зменшення площі регенеруючих волокон при застосуванні МСК, очевидно, зумовлене збереженням даних структур до 21-ої

добу дослідження (табл. 4.2, рис. 4.25). Незначне збільшення площі ушкоджених волокон при застосуванні МСК зумовлене загальним впливом на організм даного засобу (рис. 4.23).



А

Б

Рисунок 4.22 – М'язи тварини ділянки пошкодження на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. а) відновлення структури м'язових волокон, ущільнення колагенових волокон, відсутність набряку; б) добре візуалізується поперечна посмугованість м'язових структур. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

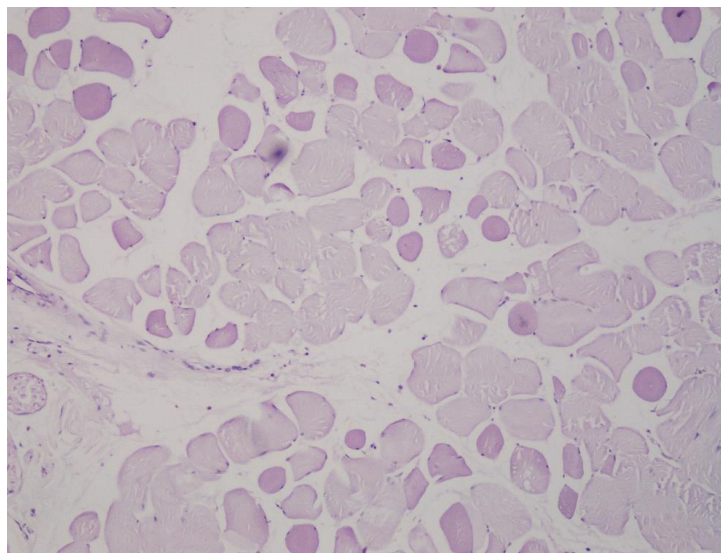


Рисунок 4.23 – М'язи тварини ділянки пошкодження на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Помірна гіпертрофія окремих м'язових волокон та дистрофічно-некротичні зміни. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

Порівнюючи площу пошкоджених волокон в ділянці травми на 14-ту та 21-шу доби встановлено, що у тварин яким не проводилась корекція PRP кількість м'язових волокон, які зазнали різного роду деструкції була достовірно більшою, ніж у тварин, яким проводилась корекція PRP (табл. 4.2). Гістохімічний аналіз ділянки пошкодження встановив, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів чітко візуалізуються сформовані колагенові та еластичні волокна (рис. 4.24), які ставали більш структурованими, адаптованими до функціонування м'язами; різко зменшувалась площа ділянки пошкодження, практично не візуалізувався набряк як в ділянці травми так і міжм'язовому інтерстиції, і такі прояви спостерігались при місцевому застосуванні PRP.

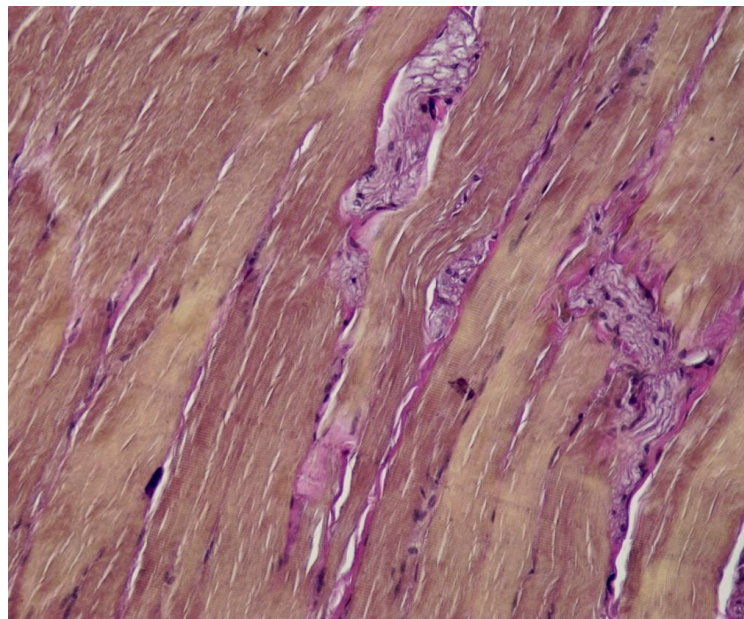


Рисунок 4.24 – М'язи тварини в ділянці пошкодження на 21-шу добу травматичного ушкодження м'язів та корекції PRP. Добре виражена гіалінізована строма. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 100$

Гістохімічний аналіз ділянки пошкодження встановив, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК у стромі поряд із гіалінізованими колагеновими волокнами візуалізувався помірний набряк (рис. 4.25).

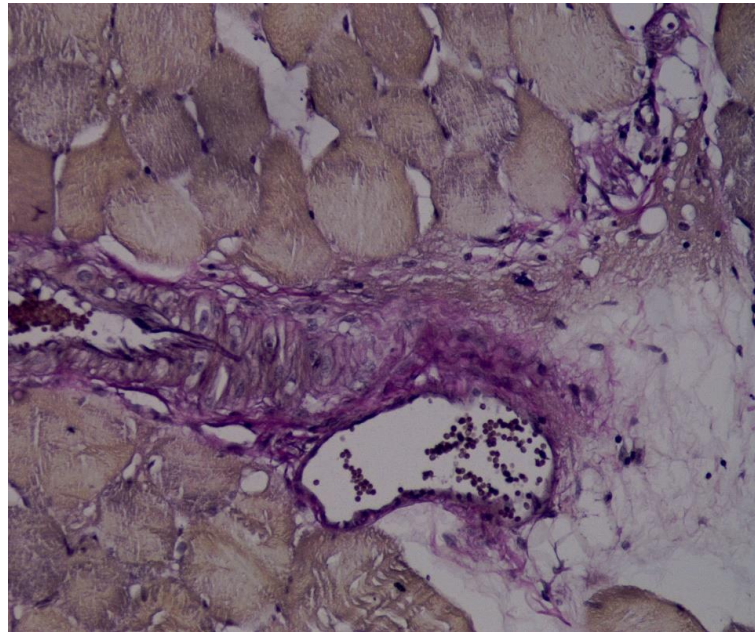


Рисунок 4.25 – Ділянка пошкодження тварини на 21-шу добу травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. Ущільнена гіалінізована строма у поєднанні із набряком. Забарвлення за ван Гізон-Вейгерт $\times 200$

4.3 Динаміка структурних морфологічних змін нирок, печінки та легень у тварин з травматичним ушкодженням м'язів та проведенні корекції збагаченої тромбоцитами плазми та мезенхімальними стовбуровими клітинами

На 1-шу добу експерименту в легенях структурні зміни проявлялись переважно вираженими розладами кровообігу і пов'язаними із цим функціональними змінами. В судинах спостерігалось нерівномірне кровонаповнення з переважанням кровонаповнення венозного русла. Помірні застійні явища потенціювали розвиток периваскулярного набряку (рис. 4.26), який проявлявся периваскулярно, збільшуючи площу строми. Міжальвеолярні перетинки потовщувались переважно на збільшення повнокров'я судин. Лімфо-плазмоцитарна інфільтрація була дрібновогнищевою. Окремі міжальвеолярні перетинки розривались, що потенціювало формування дистелектазів.

Бронхіоли дещо спазмувались, в їх просвітах візуалізувалась незначна кількість ексудату. Перибронхіолярні ділянки мали звичайну структуру із мінімальною клітинною інфільтрацією.

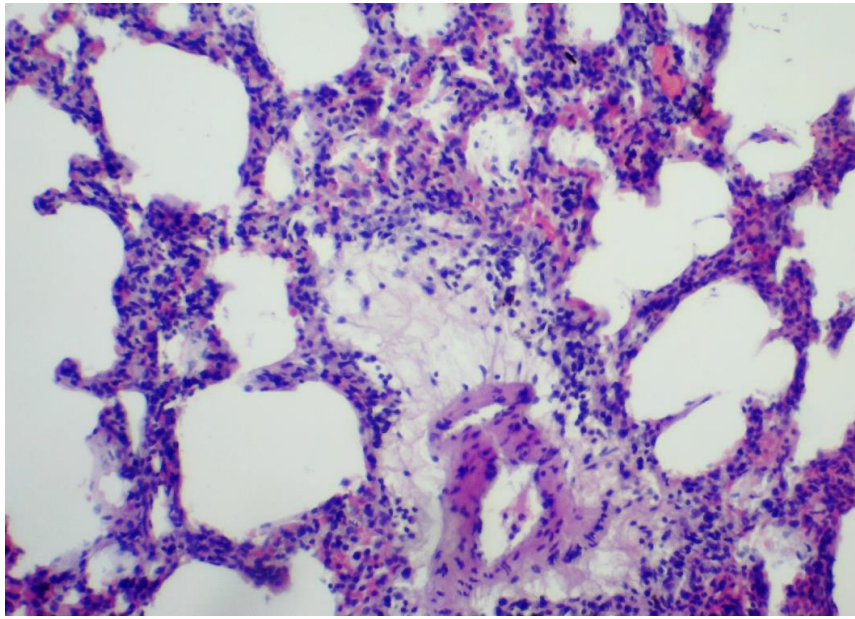


Рисунок 4.26 – Структура легені тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Виражений периваскулярний набряк, часткове повнокров'я судин дрібного калібру. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

На 1-шу добу експерименту в печінці спостерігалось наростання застійних явищ, що проявлялось розширенням та повнокров'ям центральних вен (рис. 4.27) При цьому синусоїди не розширювались, просвіти переважно були вільними від еритроцитів, або містили незначну їх кількість. Незначна макрофагальна інфільтрація виявлялась лише централобулярно. Гепатоцити зберігали свою балкову організацію та міжклітинні контакти. Частина гепатоцитів переважно середньої третини часточки мала ознаки білкової дистрофії (рис. 4.27).

Переважає більшість гепатоцитів містила практично незмінені ядра. Портальні тракти змінювались мало, повнокров'я судин було незначним, периваскулярний набряк не візуалізувався, лімфо-гістіоцитарна інфільтрація була мінімальною (рис. 4.27). Ознак холестазу не виявлено.

У нирках кровонаповнення судин залишалось нерівномірним, спостерігалось його збільшення у венозному руслі і зменшення в артеріальному. В кірковому шарі структура клубочків не змінювалась, кровонаповнення судин клубочків дещо збільшувалось, окремі судини

розширювались, ставали повнокровними, ендотеліальні клітини артеріол пошкоджувались незначно.

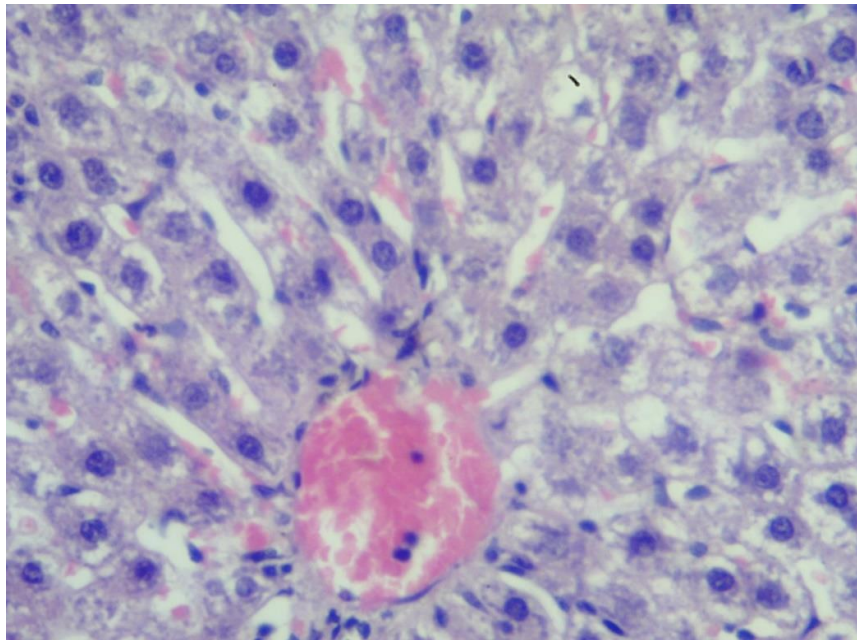


Рисунок 4.27 – Структура печінки тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Розширення центральної вени, дистрофічні зміни. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Просвіти капсул не збільшувались, нефротелій зовнішнього листа капсули дещо сплющувалася. В інтерстиції просвіти судин венозного русла були дещо розширеними, місцями повнокровними, спостерігався периваскулярний набряк. В епітеліоцитах звивистих каналців цитоплазма частини клітин просвітлювалася, ставала зернистою, оксифільною, непрозорою, що обумовлено наявністю різноманітних включень (рис. 4.28). Ядра візуалізувались у переважній більшості клітин, окремі ядра були гіперхромні, з наявністю ядерця, розташовані базально, міжклітинні контакти залишались переважно збереженими. Просвіти більшості вивідних каналців не розширювались, або розширювались частково, проте були вільними від білкових депозитів та клітинних елементів (рис. 4.28). Базальні мембрани каналців частково потовщувались за рахунок повнокров'я судин.

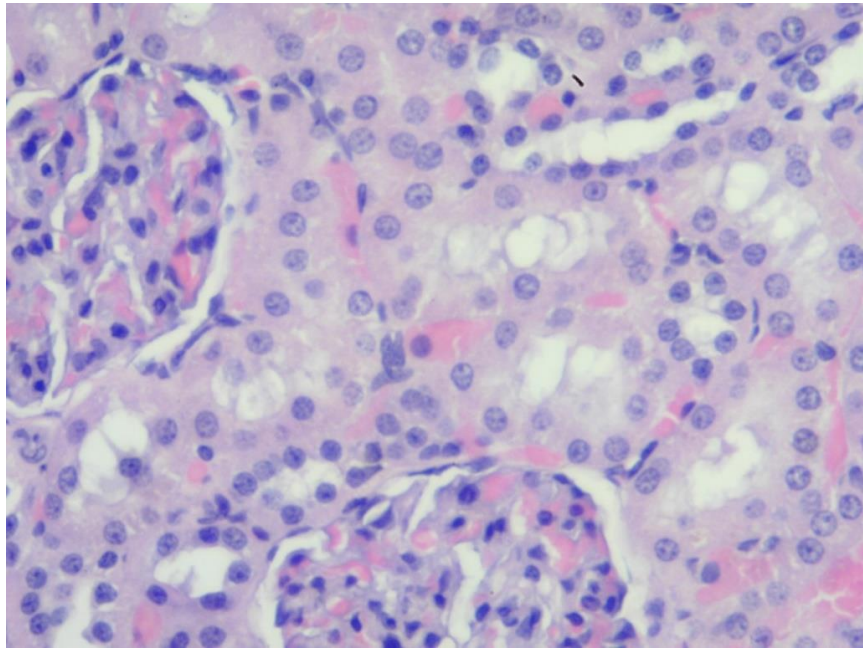


Рисунок 4.28 – Структура нирки тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Помірне збільшення кровонаповнення судин клубочків, потовщення базальних мембран вивідних каналців. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

На 1-шу добу експерименту при корекції PRP в легенях структурні прояви супроводжувались розладами кровообігу і пов'язаними із цим функціональними змінами. В судинах залишалось нерівномірне кровонаповнення з переважанням кровонаповнення венозного русла. Дещо зменшувався периваскулярний набряк (рис. 4.29). Міжальвеолярні перетинки місцями залишались потовщеними переважно через збільшення повнокров'я судин. Лімфо-плазмоцитарна інфільтрація залишалась незначною. Спостерігались дистелектази. Бронхіоли були спазмованими, в їх просвітах візуалізувалась незначна кількість ексудату та злущені епітеліоцити (рис. 4.29). Перибронхіолярні ділянки мали звичайну структуру із помірною клітинною інфільтрацією.

Корекція МСК проявлялась незначними структурними проявами в легеневій тканині. Так дещо зменшувалась площа дистелектазів, альвеоли

переважно залишались розширеними, не містили ексудату. В міжальвеолярних перетинках залишалась помірна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація (рис. 4.30).

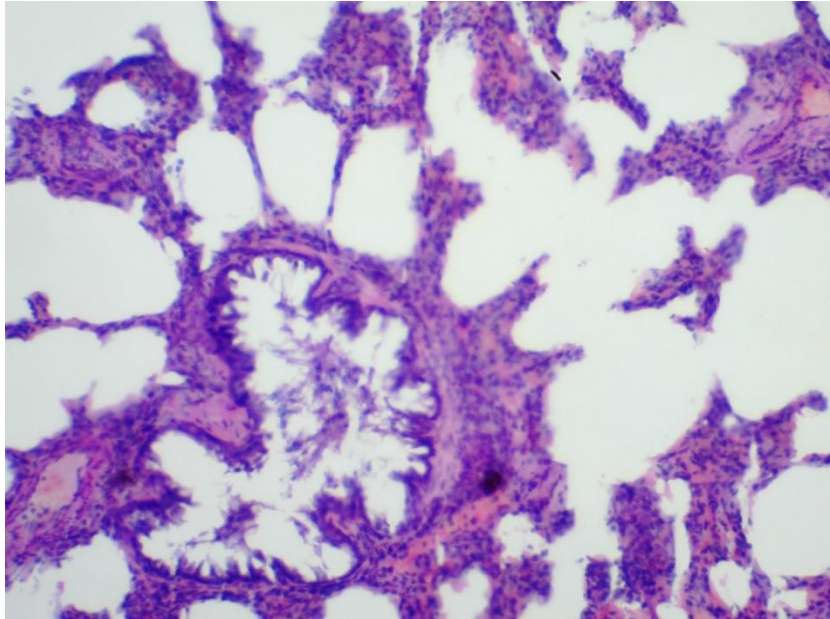


Рисунок 4.29 – Структура легені тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Спазм бронхіол, формування ділянок дистелектазів. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

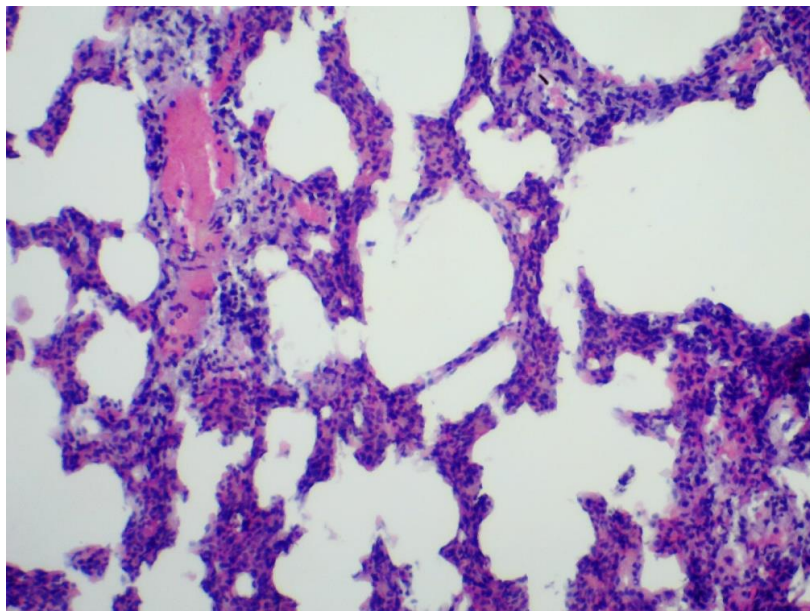


Рисунок 4.30 – Структура легені тварини на 1 добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Дистелектази. Просвіти альвеол не містять ексудату. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 100$

При корекції PRP на 1-шу добу експерименту в печінці спостерігалось помірні застійні явища в центральних венах та центролобулярних ділянках синусоїдів, що супроводжувалось їх повнокров'ям. В гепатоцитах переважно середньої третини часточки виявлялись найбільші прояви розвитку білкової дистрофії. Макрофагальна інфільтрація візуалізувалась як центролобулярно, так і по всій величині часточки та в ділянках триад. Гепатоцити частково зберігали свою балкову організацію та міжклітинні контакти (рис. 4.31). В переважній більшості гепатоцитів ядра змінювались, просвітлювались, окремі зникали. Портальні тракти не розширювались, периваскулярний набряк не візуалізувався, лімфо-гістіоцитарна інфільтрація була мінімальною, ознак холестазу не виявлено.

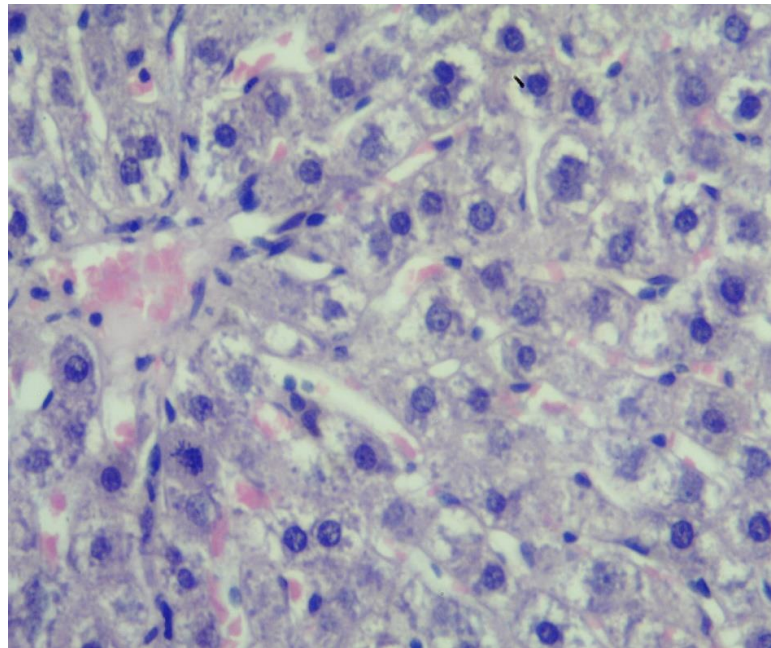


Рисунок 4.31 – Структура печінки тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 200. Повнокров'я судин, збільшення макрофагальної реакції (вогнищеві застійні явища), дистрофічно-некротичні зміни

Корекція МСК на 1-шу добу експерименту встановила помірні застійні явища переважно в ділянках портальних трактів, що супроводжувалось їх збільшенням кровонаповнення. В гепатоцитах усіх ділянок часточки

візуалізувалась переважно білкова дистрофія, макрофагальна інфільтрація переважала в ділянках триад. В переважній більшості гепатоцитів ядра візуалізувались добре, проте мала місце білкова дистрофія клітин. Периваскулярний набряк не візуалізувався, лімфо-гістіоцитарна інфільтрація була мінімальною, ознак холестазу не виявлено (рис. 4.32).

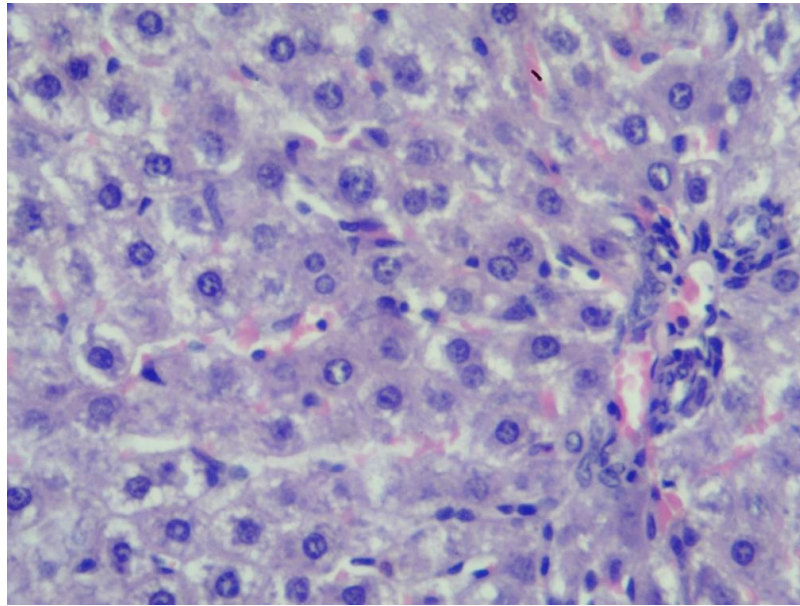


Рисунок 4.32 – Структура печінки тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 200. Повнокров'я судин портальних трактів

При корекції PRP у нирках кровонаповнення судин залишалось нерівномірним, як і в попередньому випадку, спостерігалось його збільшення у венозному руслі і зменшення в артеріальному (рис. 4.33). В кірковому шарі структура клубочків не змінювалась, ендотеліальні клітини артеріол не пошкоджувались, просвіти капсул не збільшувались, нефротелій зовнішнього листа капсули практично не змінювався.

В інтерстиції просвіти судин венозного русла були дещо розширеними, повнокровними, спостерігався периваскулярний набряк. В епітеліоцитах вивідних каналців цитоплазма клітин переважно була однорідною. Ядра візуалізувались у переважній більшості клітин, окремі ядра були гіперхромні, з наявністю ядерець,

розташовані базально, міжклітинні контакти залишались збереженими, базальні мембрани збережені. Просвіти більшості вивідних каналців не розширювались, були вільними від ексудату та клітинних елементів (рис. 4.33).

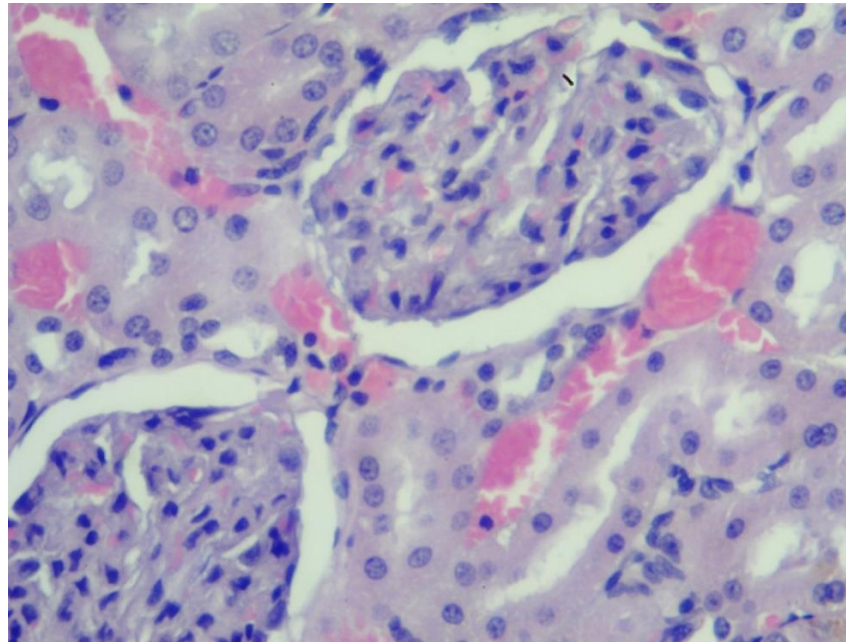


Рисунок 4.33 – Нирка тварини на 1-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Збільшення кровонаповнення судин переважно венозного русла. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

При корекції МСК структурні прояви в нирках майже не відрізнялись від аналогічних як при корекції PRP (рис. 4.34).

На 7-му добу після моделювання травматичного ушкодження м'язів в легенях різко збільшувалось кровонаповнення судин переважно дрібного калібру. Міжальвеолярні проміжки потовщувались переважно через дрібновогнищевий еритродіapedез або помірний периваскулярний набряк (рис. 4.35). Епітелій при цьому змінювався мало. Просвіти альвеол були вільними від ексудату та клітинних елементів.

Бронхіоли спазмувались, їх просвіти різко звужувались (рис. 4.36). В перибронхіолярних ділянках строми візуалізувалась помірна кількість лімфо-та гістіоцитів.

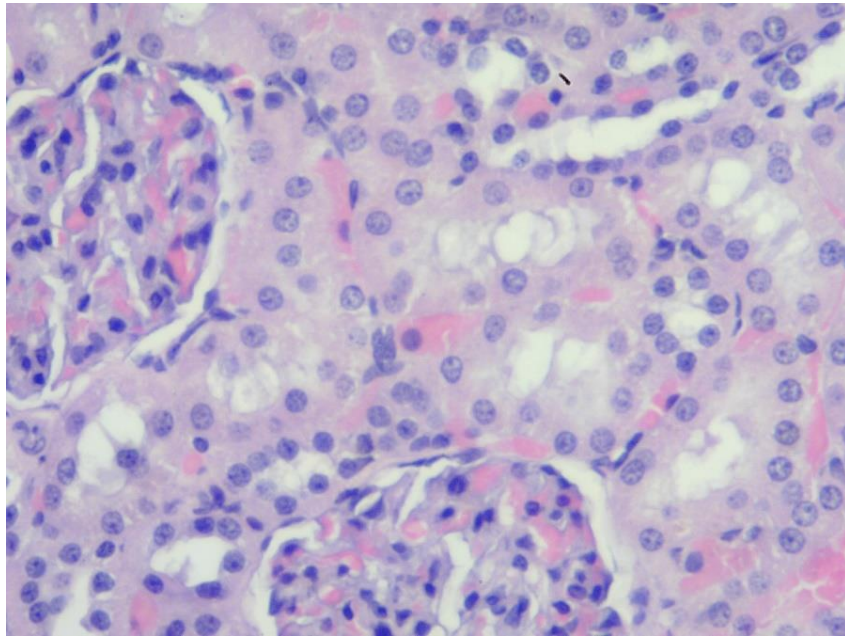


Рисунок 4.34 – Нирка тварини на 1 добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Помірне кровонаповнення судин переважно венозного русла. Забарвлення гематоксилином та еозином. x 200

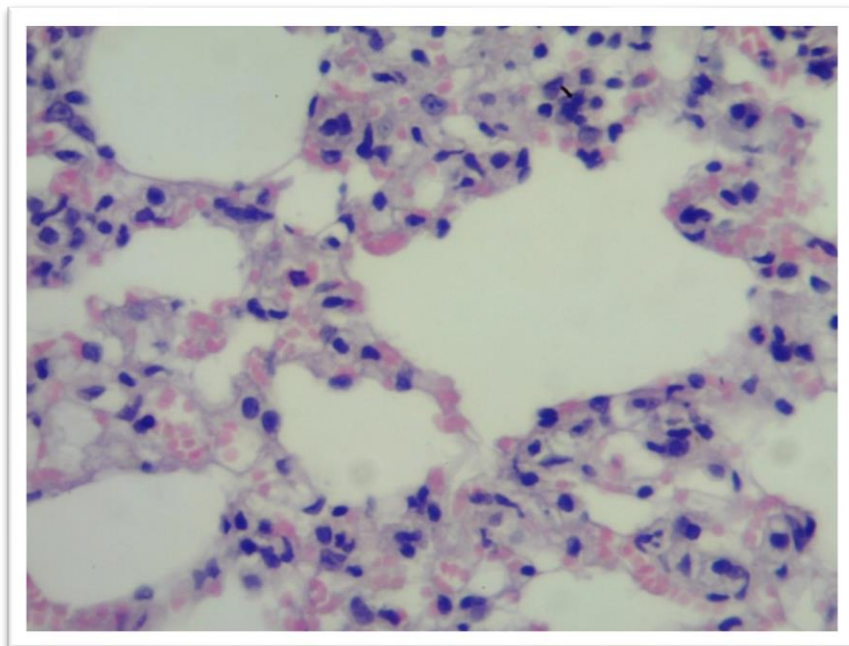


Рисунок 4.35 – Структура легені тварини на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів. Збільшення кровонаповнення судин дрібного калібру, вогнищеві еритродіapedези. Забарвлення гематоксилином та еозином. × 200

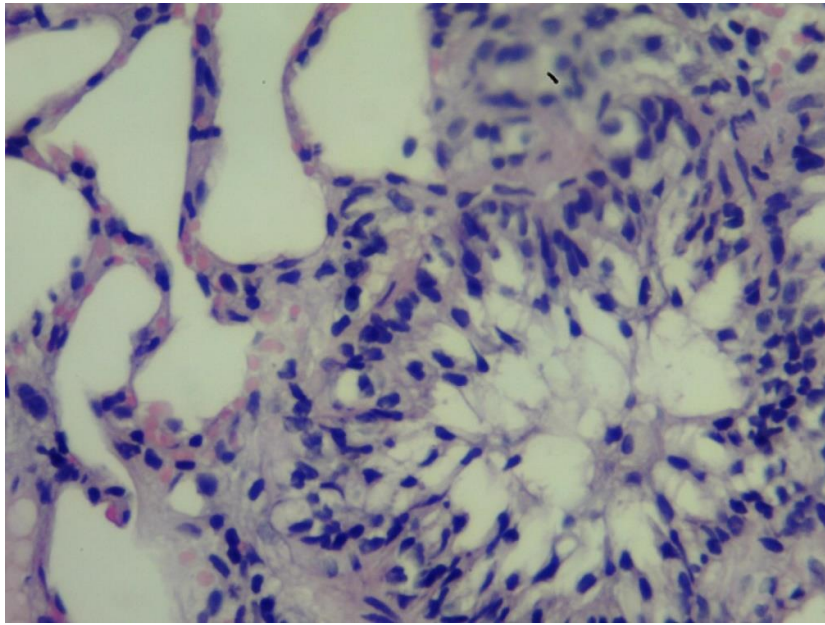


Рисунок 4.36 – Структура легені тварини на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів. Спазм бронхіол, формування ділянок дистелектазів. Спазм бронхіол, вогнищева лімфо-гістіоцитарна інфільтрація перибронхіолярних ділянок. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

На 7-му добу моделювання травматичного ушкодження м'язів в печінці продовжували наростати і поглиблюватись застійні явища, що проявлялось розширенням центральних вен, розширенням та повнокров'ям синусоїдів. В їх просвітах візуалізувалась значна кількість еритроцитів. Балкова організація гепатоцитів порушувалась, міжклітинні контакти зберігались частково. Візуалізувалось наростання дистрофічних змін в гепатоцитах, переважно гіаліново -крапельної та гідропічної дистрофії (рис. 4.37).

В кірковій та мозковій речовині нирки кровонаповнення залишалось нерівномірним, проте візуально менш вираженим, ніж у попередній групі. Мало місце плазматичне просякання не лише артеріального, але венозного русла та посилення набряку інтерстицію, місцями з вираженим геморагічним компонентом (рис. 4.38) та лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією.

Структура ниркових клубочків залишалася переважно збереженою, проте з'являвся виражений набряк капсул Шумлянського-Боумена з деформацією судин клубочка (рис. 4.38), розширення капілярів судинних клубочків, набряк

ендотеліоцитів та базальних мембран, пошкодження епітелію зовнішнього листка капсули. В проекції ЮГА формувались інфільтрати із лімфо- та плазмоцитів.

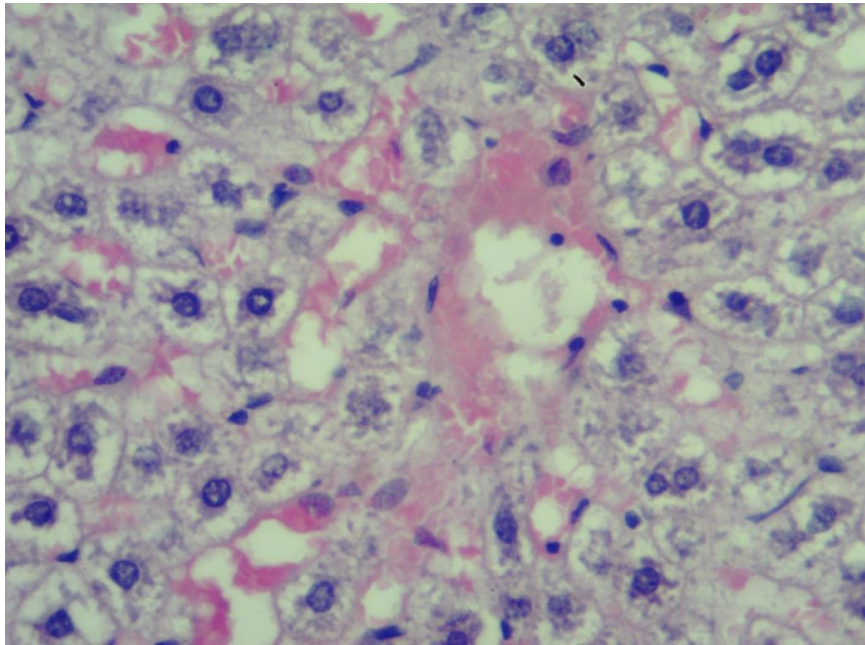


Рисунок 4.37 – Печінка тварини на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів. Повнокров'я синусоїдів, виражені дистрофічні зміни в гепатоцитах.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

В інтерстиційній тканині просвіти судин венозного русла були дещо розширеними, повнокровними, проте набряк не розвивався. Цитоплазма епітелію вивідних каналців залишалась переважно однорідною, дещо просвітленою, слабше сприймала барвники. Ядра візуалізувались у більшості клітин, розташовані переважно базально, міжклітинні контакти залишались збереженими, базальні мембрани збереженими. Просвіти більшості вивідних каналців не розширювались, були вільними від білкового детриту та клітинних елементів (рис. 4.38).

На фоні лікування PRP через сім діб експерименту в легенях тварин помірно зменшувалось кровонаповнення судин переважно дрібного калібру, практично зникав еритродіapedез. Епітелій при цьому залишався дещо

набряклим. Просвіти альвеол були вільними від ексудату та клітинних елементів. Спазм бронхіол зменшувався, в перибронхіолярних ділянках строми візуалізувалась вогнищева лімфо-та гістіоцитарна інфільтрація.

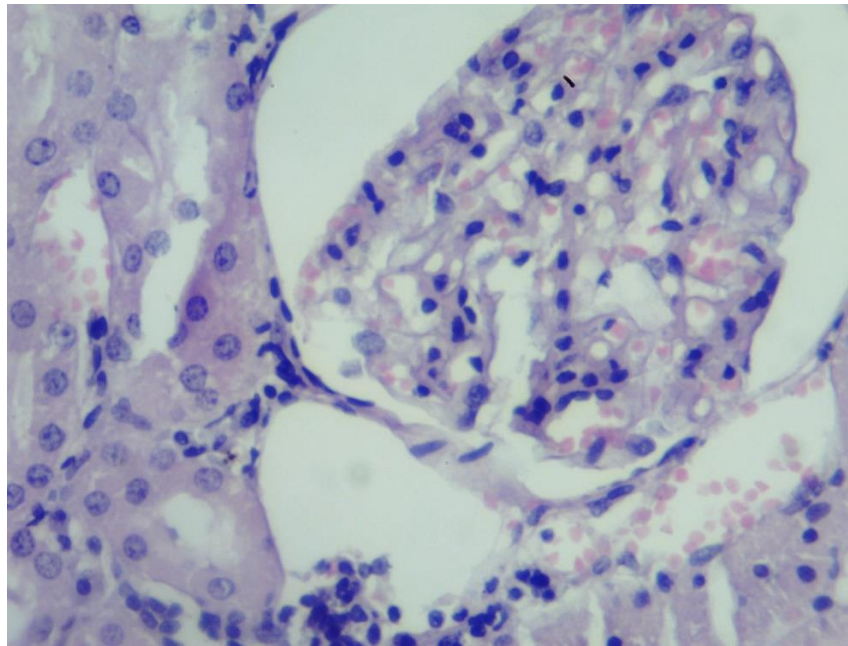


Рисунок 4.38 – Нирка тварини на 7-му добу травматичного ушкодження м'язів. Набряк капсули, формування лімфо-плазмоцитарного інфільтрату. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Застосування МСК призводило до значного зменшення проявів інтерстиційного периваскулярного набряку, що проявлялось вираженим стоншенням міжальвеолярних перетинок (рис. 4.39).

При корекції PRP на 7-му добу експерименту в печінці залишалось значне розширення центральних вен та часткове порушення балкової організації гепатоцитів. Проте застосування МСК зменшило наростання застійних явищ, яке відображалось зменшенням повнокров'я центральних вен та синусоїдів (рис. 4.40). Як і в попередній групі досліджень, найбільш чутливими до ендогенної інтоксикації виявились гепатоцити середньої третини часточки, в яких переважали виражені дистрофічні та дистрофічно-некротичні зміни, втрачались міжклітинні контакти. Проте з'являлись ділянки посиленої регенерації клітин, збільшувалась макрофагальна активність.

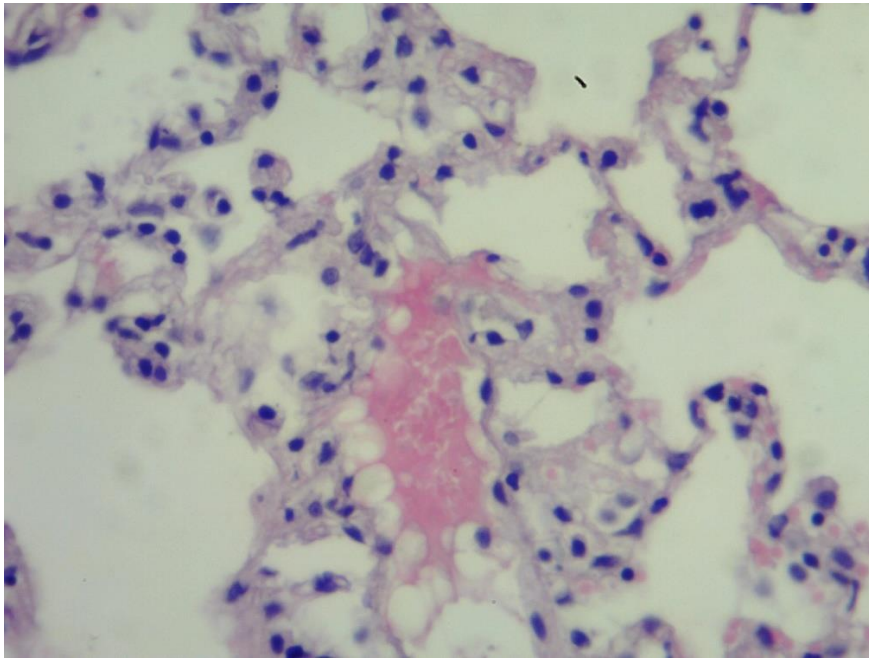


Рисунок 4.39 – Легені тварини на 7-му добу травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. Зменшення еритродіapedезу та периваскулярного набряку. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

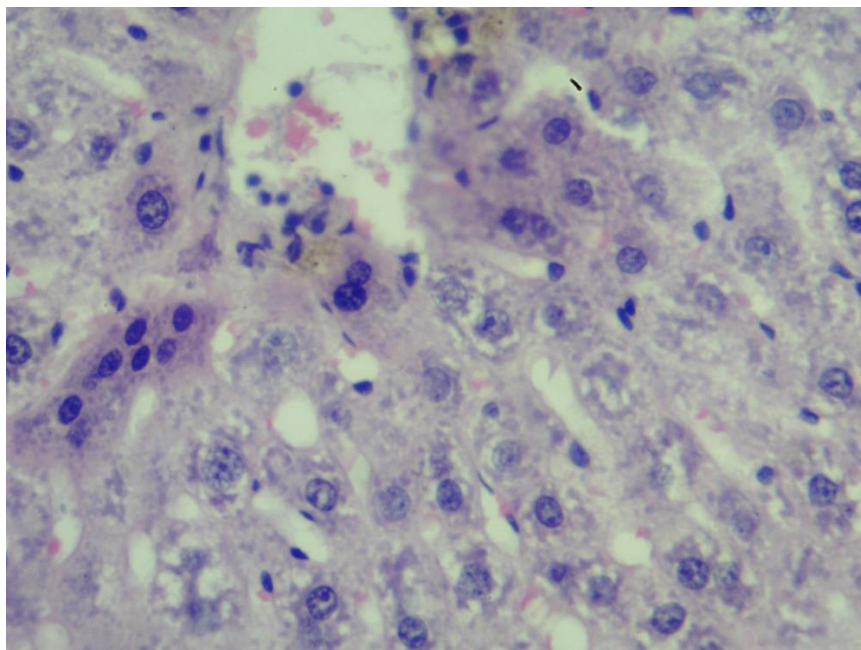


Рисунок 4.40 – Печінка тварини на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. Дистрофічні зміни гепатоцитів, ділянки посиленої регенерації. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

При корекції PRP у нирках кровонаповнення судин дещо зменшувалось (рис. 4.41). В кірковому шарі судинні клубочки залишались помірно збільшеними, просвіти судин розширеними, проте не повнокровними. Ендотеліальні клітини артеріол не пошкоджувались, просвіти капсул зменшувались, нефротелій зовнішнього листа капсули практично не змінювався. МСК мали аналогічний вплив на структурні прояви в нирці.

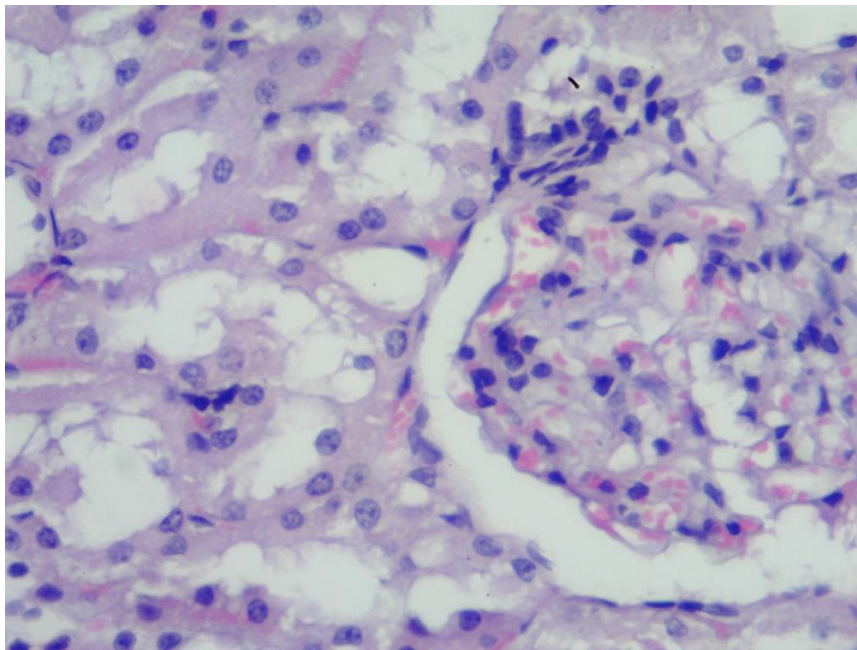


Рисунок 4.41 – Нирка тварини на 7-му добу після травматичного ушкодження м'язів та корекції МСК. Дещо розширені судини клубочка. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

В інтерстиції просвіти судин венозного русла залишались незначно розширеними, помірно повнокровними, периваскулярний набряк не спостерігався.

В епітеліоцитах вивідних каналців цитоплазма клітин переважно була однорідною, проте окремі клітини містили вакуолі. Ядра візуалізувались у переважній частині клітин просвітлювалась, містила вакуолі. Ядра були нормохромні, з наявністю ядерця, розташовані переважно базально, міжклітинні контакти в більшості залишались збереженими, базальні мембрани

збережені. Просвіти вивідних каналців частково розширювались, були вільними від білкового детриту та клітинних елементів (див. рис. 4.41).

На 14-ту добу експерименту в легенях виявлено помірне збільшене кровонаповнення переважно венозного русла. В судинах більшого калібру візуалізувалась сепарація еритроцитів. Плазматична інфільтрація стінок судин потенціювала формування фібринових тромбів (рис. 4.42).

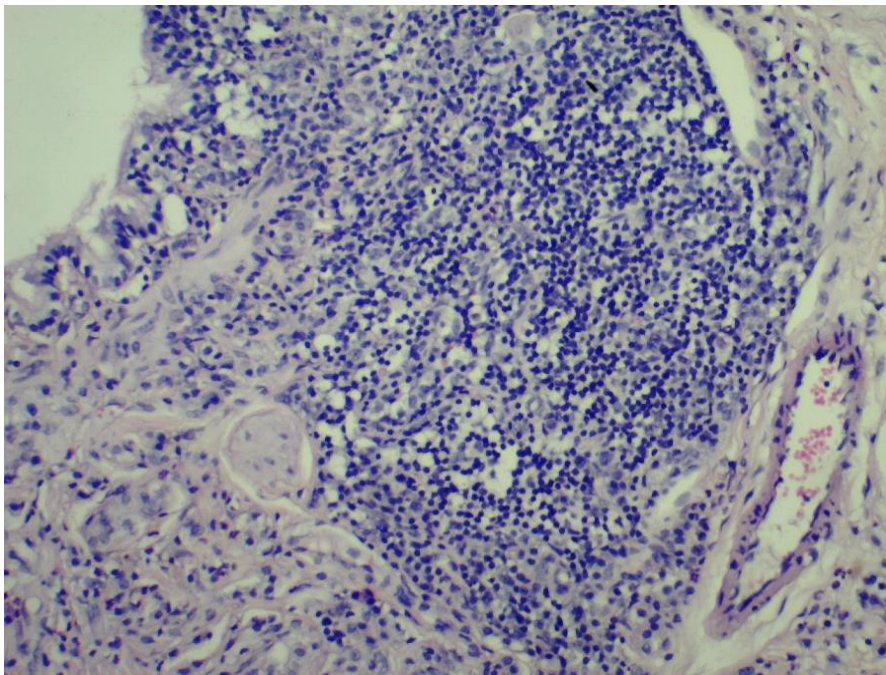


Рисунок 4.42 – Легеня тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Формування лімфоїдних інфільтратів. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

В паренхімі легені візуалізувались вогнищеві дистелектази. Окремі міжальвеолярні перетинки потовщувались за рахунок вогнищевої клітинної інфільтрації та незначного набряку, який поширювався переважно із периваскулярних просторів. В бронхах спостерігалась дистонія із вогнищевими спазмами стінок, місцями із десквамацією епітелію (рис. 4.43).

В перибронхіальних зонах зростала лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, що потенціювало формування лімфоїдних інфільтратів (див. рис. 4.42, 4.43). Мали місце еритростази в судинах дрібного калібру. Альвеоли залишались дещо

розширеними, що свідчило про розвиток вогнищевої емфіземи, їх просвіти залишалися вільними від ексудату (рис. 4.44).

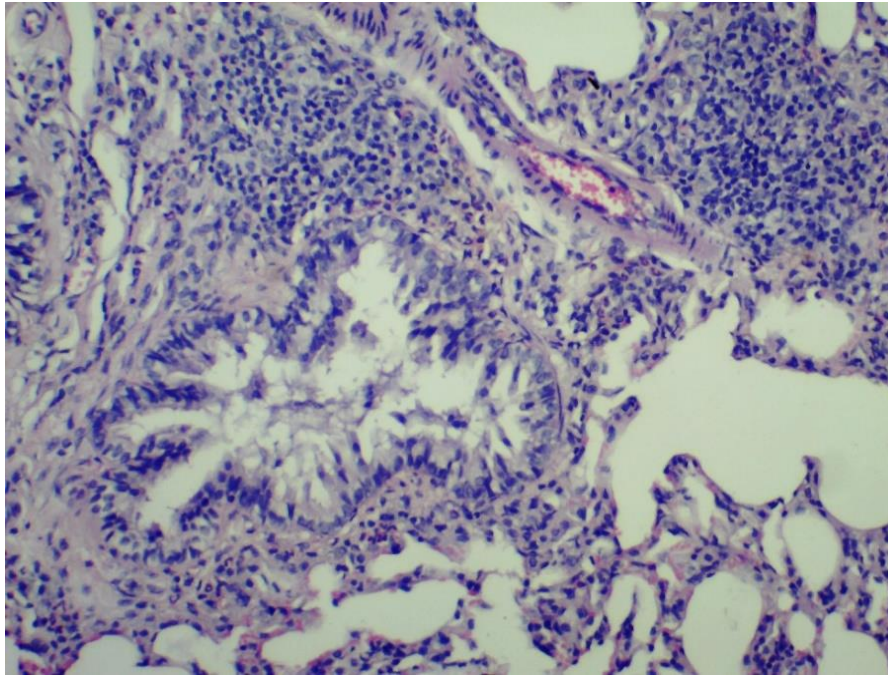


Рисунок 4.43 – Легеня тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Спазм бронхіол, формування лімфоїдних інфільтратів. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Форма печінкових часточок різко порушувалась. В центролобулярних ділянках практично не візуалізувались центральні вени, проте мало місце застійне повнокров'я і розширення синусоїдів із дрібними центролобулярними некрозами гепатоцитів. У гепатоцитах середньої третини та перипортальних трактів спостерігалось переважання білкової гідропічної дистрофії, помірної лімфо-гістіоцитарної інфільтрації синусоїдів та збільшення кількості клітинних макрофагів у просвітах синусоїдів.

В гепатоцитах перипортальних зон з'являлось внутрішньоклітинне накопичення білірубінового пігменту, що посилювало наростання функціональної недостатності паренхіми печінки (рис. 4.45), проте значна частина клітин залишались функціонально активними. Балкова організація клітин порушувалась, міжклітинні контакти верифікувались слабо. Лише незначна частина гепатоцитів містила практично незмінені ядра. В окремих

клітинах на фоні деструктивних змін цитоплазми ядра мали ознаки каріопікнозу та каріолізису, що свідчило про наявність дистрофічно-некротичних проявів (рис. 4.46).

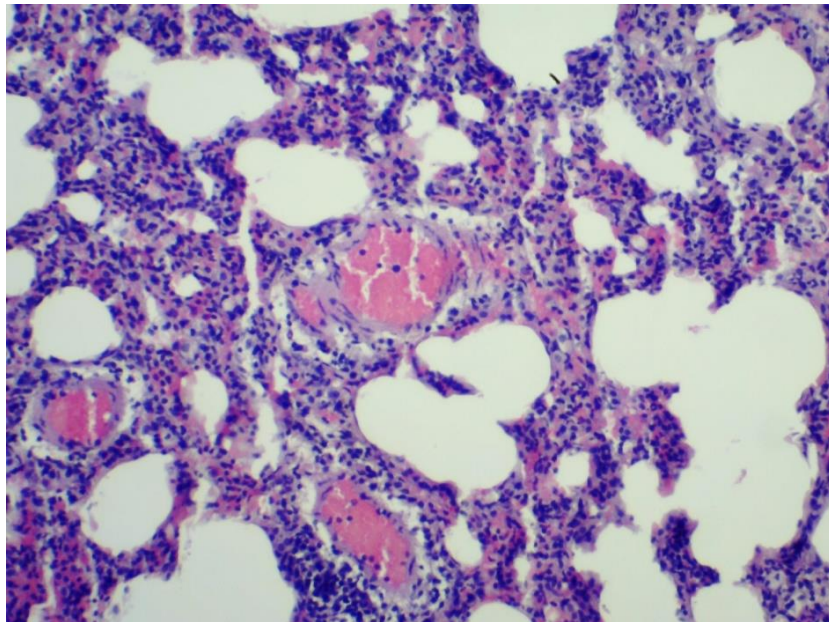


Рисунок 4.44 – Легеня тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Еритростази, ділянки дистелектазів, дрібновогнищева емфізема.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

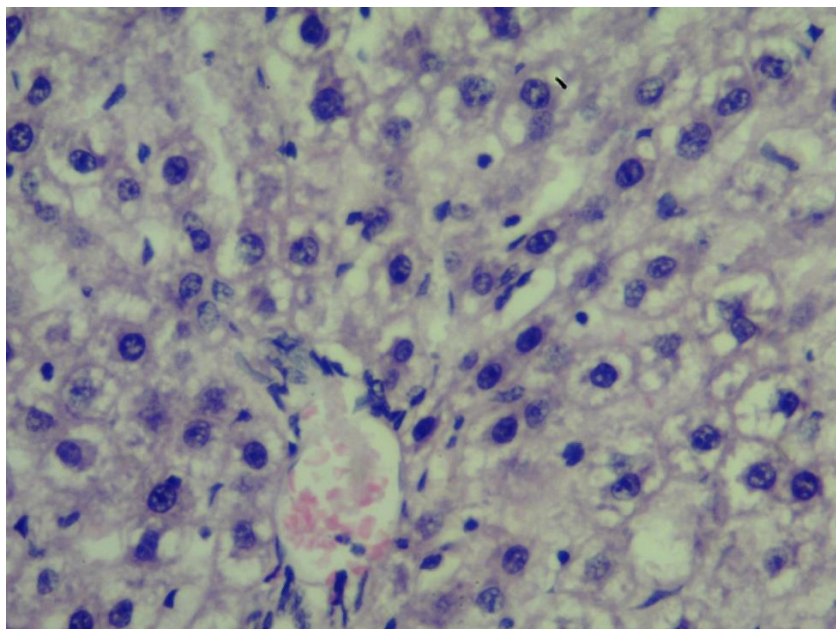


Рисунок 4.45 – Печінка тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Гідропічна (балонна) дистрофія гепатоцитів. Забарвлення

гематоксиліном та еозином. $\times 200$

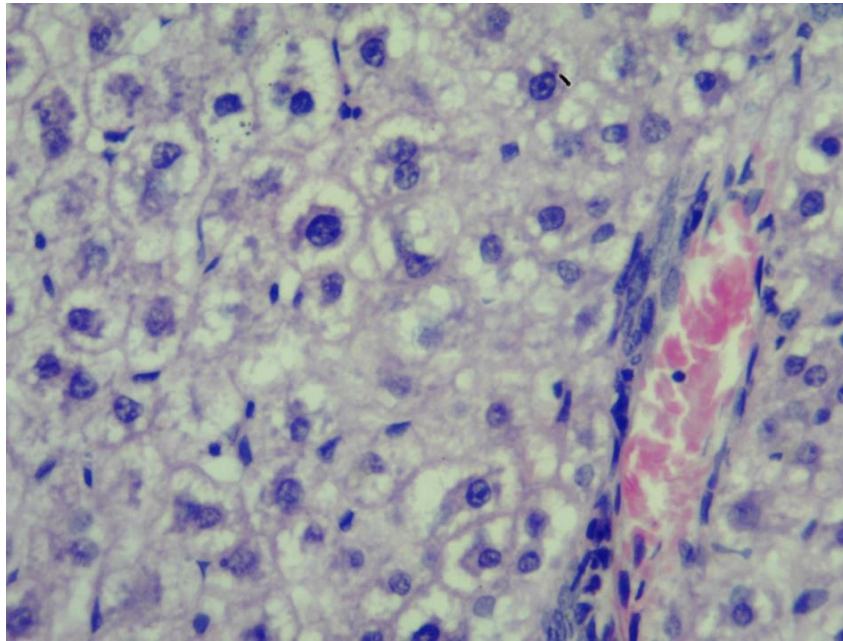


Рисунок 4.46 – Печінка тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Порушення балкової організації, дистрофічно-некротичні зміни гепатоцитів, повнокров'я судин портальних трактів. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Площа портальних трактів дещо збільшувалась, за рахунок повнокров'я судин, посилення периваскулярної лімфо-плазмоцитарної інфільтрації, Дрібновогнищева ретикулоендотеліальна інфільтрація виявлялась переважно централобулярно і незначно по ходу розширених синусоїдів.

Дослідження нирок встановило помірне збільшення кровонаповнення кіркової і мозкової речовини. В кірковому шарі структура клубочків залишалась переважно збереженою. Кровонаповнення судин окремих клубочків було значним (рис. 4.47), ендотеліальні клітини артеріол пошкоджувались мало. Епітеліоцити зовнішнього листка капсули незначно сплющувались, проте візуалізувались практично у всіх клубочках.

В інтерстиції просвіти судин венозного русла були дещо розширеними, місцями повнокровними (рис. 4.47). Структура переважної більшості епітеліоцитів вивідних каналців мала різні стадії розвитку білкової дистрофії, у незначної частини із них виявлялись ознаки апоптозу. Ядра візуалізувались у

переважної більшості клітин, проте їх локація була різною. Окремі ядра були гіперхромні, з наявністю ядерців, розташовані базально, міжклітинні контакти частково збережені. Просвіти переважної більшості вивідних каналців розширювались, із мінімальними включеннями.

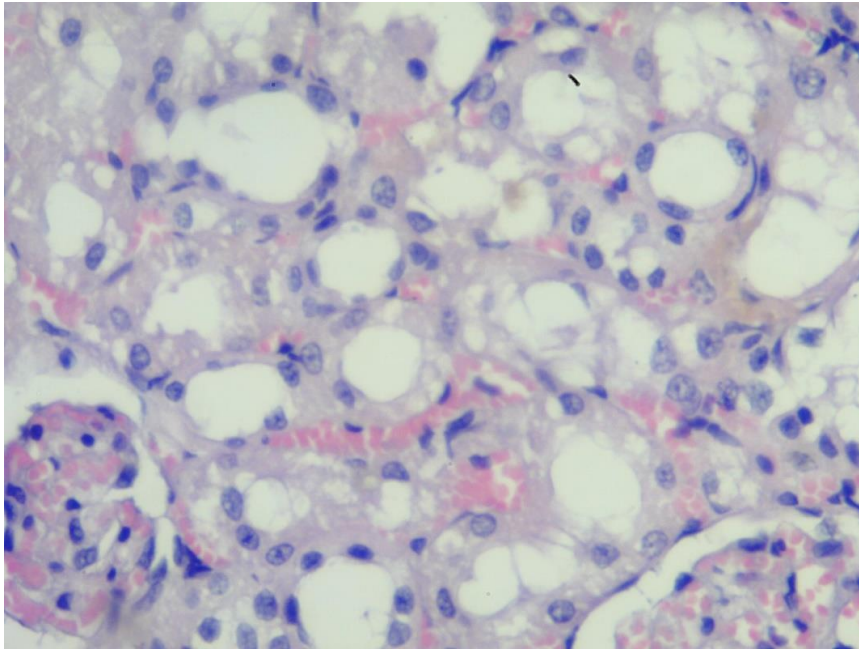


Рисунок 4.47 – Нирка тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів. Повнокров'я синусоїдів, виражені дистрофічні зміни в гепатоцитах.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

На 14-ту добу експерименту при корекції PRP в легенях значно зменшувалось кровонаповнення венозного русла, проте в паренхімі легені все ще візуалізувались вогнищеві дистелектази. Окремі міжальвеолярні перетинки залишались потовщеними переважно за рахунок клітинної інфільтрації та незначного набряку (рис. 4.48). В бронхах спостерігалась дистонія із вогнищевими спазмами стінок. В перибронхіальних зонах дещо знижувалась лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, проте все ще залишалась значною. Мали місце еритростази в судинах дрібного калібру. Альвеоли залишались дещо розширеними, їх просвіти – вільними від ексудату. При застосуванні МСК, як і в попередній групі досліджень (на 7-му добу) різко зменшувалось

кровонаповнення судин та периваскулярний набряк, еритродіпадез не візуалізувався; міжальвеолярна строма стоншувалась. Альвеоли не містили ексудату, альвеолоцити залишались збереженими.

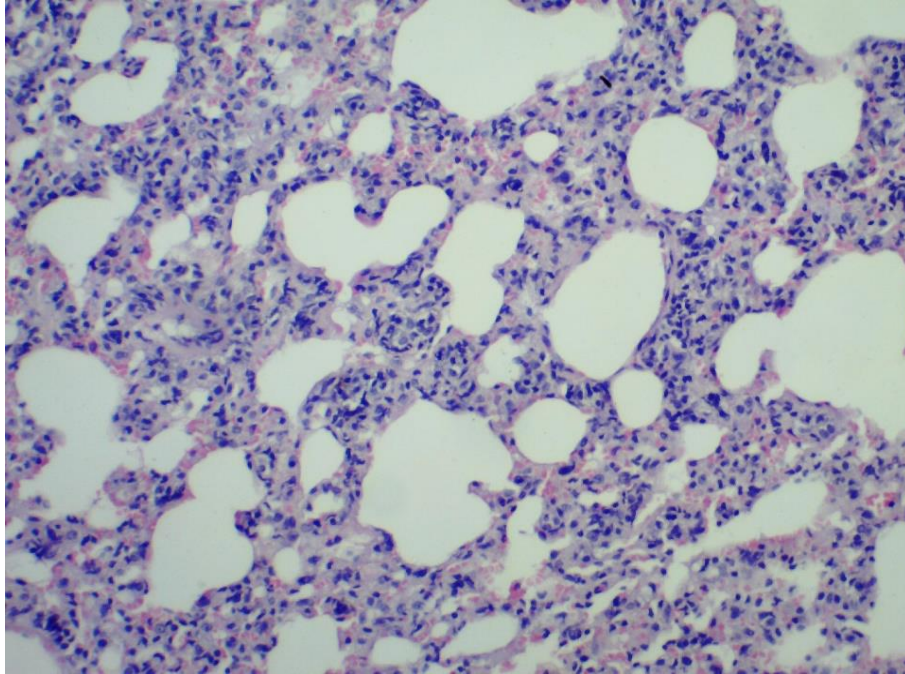


Рисунок 4.48 – Легеня тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Дрібно вогнищева лімфо-плазмоцитарна інфільтрація. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Застосування PRP з метою корекції сприяло частковому відновленню печінки. Центральні вени залишались помірно розширеними та повнокровними. Синусоїди також залишались помірно розширеними, містили незначну кількість макрофагів та еритроцитів. В гепатоцитах спостерігалось явища переважно білкової гідропічної дистрофії, зустрічались клітини із каріорексисом та ознаками апоптозу. Поряд із тим збільшувалась кількість клітин із гіперхромними ядрами або двома ядрами, що свідчить про посилення регенерації. Балкова організація клітин залишалась частково порушеною, проте міжклітинні контакти верифікувались краще. Лише незначна частина гепатоцитів містила практично незмінені ядра (рис. 4.49).

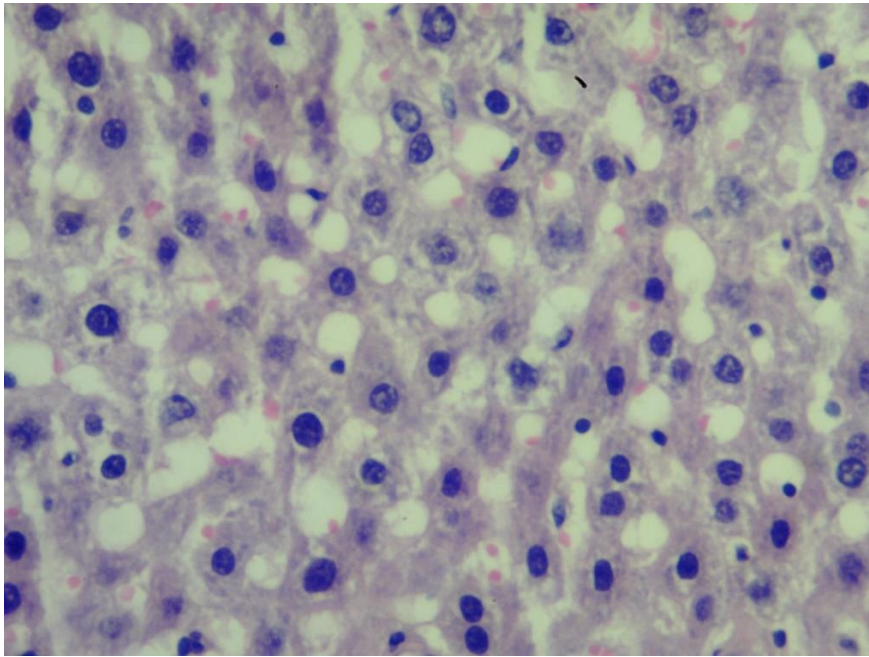


Рисунок 4.49 – Печінка тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції PRP. Двоядерні гепатоцити, відновлення балкової організації. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Площа порталних трактів залишалась збільшеною за рахунок помірного повнокров'я судин, незначної периваскулярної лімфо-плазмоцитарної інфільтрації. Дрібновогнищева ретикулоендотеліальна інфільтрація виявлялась переважно централобулярно і незначно по ходу розширених синусоїдів. Аналогічні прояви можна було спостерігати і у тварин, яким корекцію проводили МСК.

При корекції PRP у нирках кровонаповнення судин залишалось нерівномірним, як і в попередньому випадку, спостерігалось його збільшення у венозному руслі і зменшення в артеріальному (рис. 4.50). В кірковому шарі структура клубочків не змінювалась, кровонаповнення судин клубочків дещо зменшувалось. Ендотеліальні клітини артеріол не пошкоджувались, просвіти капсул не збільшувались, нефротелій зовнішнього листа капсули практично не змінювався.

При корекції МСК, як і при застосуванні PRP, в інтерстиції просвіти судин венозного русла залишались розширеними, повнокровними, проте периваскулярний набряк не спостерігався. В епітеліоцитах вивідних каналців

цитоплазма клітин переважно залишалась однорідною. Ядра візуалізувались у переважній більшості клітин, окремі ядра із ознаками гіперхромії, з наявністю ядерця, розташовані базально; міжклітинні контакти залишались збереженими, базальні мембрани збережені. Такі структурні прояви свідчать про зменшення інтоксикаційного чинника на стан епітелію. Просвіти більшості вивідних каналців не розширювались, були вільними від ексудату та клітинних елементів (рис. 4.50).

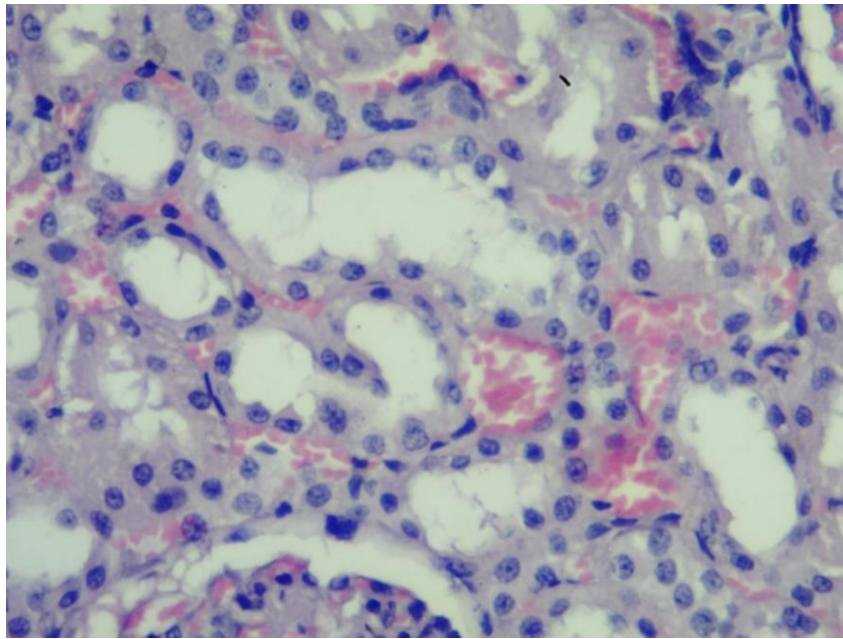


Рисунок 4.50 – Нирка тварини на 14-ту добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Повнокров'я судин строми, збереження епітеліоцитів каналців. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

На 21-шу добу після нанесення травматичного ушкодження м'язів в легенях все ще виявлялось виражене кровонаповнення судин переважно венозного русла, помірний набряк колагенової строми, який поширювався по міжальвеолярних перетинках та їх потовщення за рахунок помірної лімфо-плазмоцитарної інфільтрації. В паренхімі легені візуалізувались вогнищеві дистелектази.

В дрібних бронхах спостерігалась дистонія із вогнищевими спазмами стінок, місцями із десквамацією епітелію. В перибронхіальних зонах

залишалась лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, формувались лімфоїдні інфільтрати (рис. 4.51). Мали місце еритростази в судинах дрібного калібру. Альвеоли залишались дещо розширеними, їх просвіти залишались вільними від ексудату.

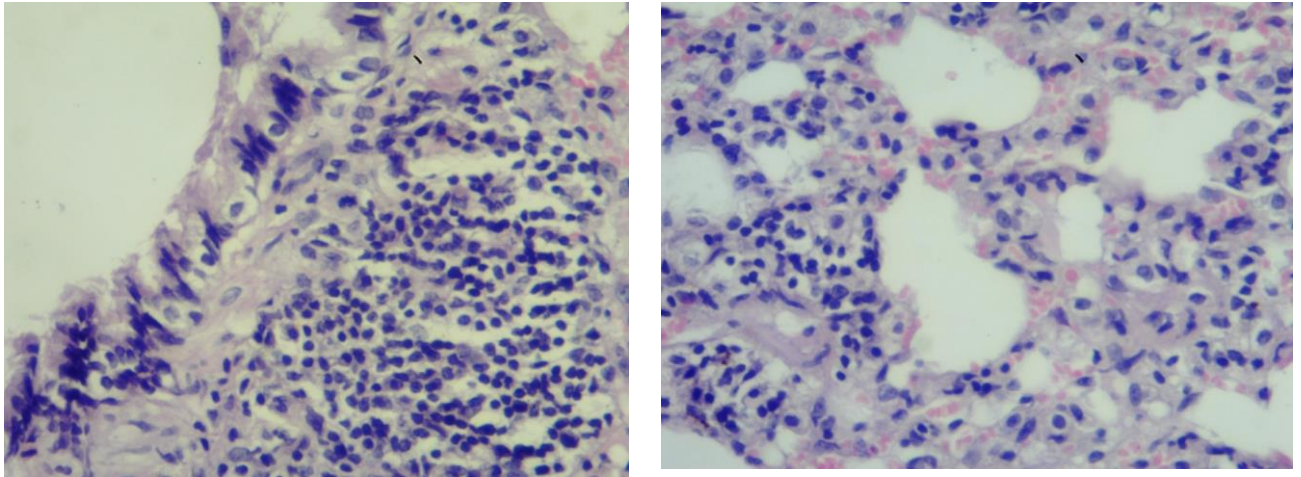


Рисунок 4.51 – Легеня тварини на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. а) Лімфоїдна інфільтрація стінки бронха; б) Потовщення міжальвеолярних перетинок за рахунок лімфо-плазмоцитарної інфільтрації, еритростази. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Структура печінкових часточок залишалась пошкодженою. Центральні вени та синусоїди центролобулярних ділянок практично не візуалізувались.

В гепатоцитів по всій величині часточки домінуючими були прояви білкової, переважно гідропічної дистрофії. В гепатоцитах перипортальних зон візуалізувалось внутрішньоклітинне накопичення білірубінового пігменту. Поряд із цим візуалізувалась значна кількість клітин із ознаками посиленої регенерації (рис. 4.52). Балкова організація клітин залишалась порушеною, міжклітинні контакти верифікувались слабо.

Площа портальних трактів зростала за рахунок посилення периваскулярної лімфо-плазмоцитарної інфільтрації. Дрібновогнищева ретикулоендотеліальна інфільтрація виявлялась переважно центролобулярно і незначно по ходу розширених синусоїдів.

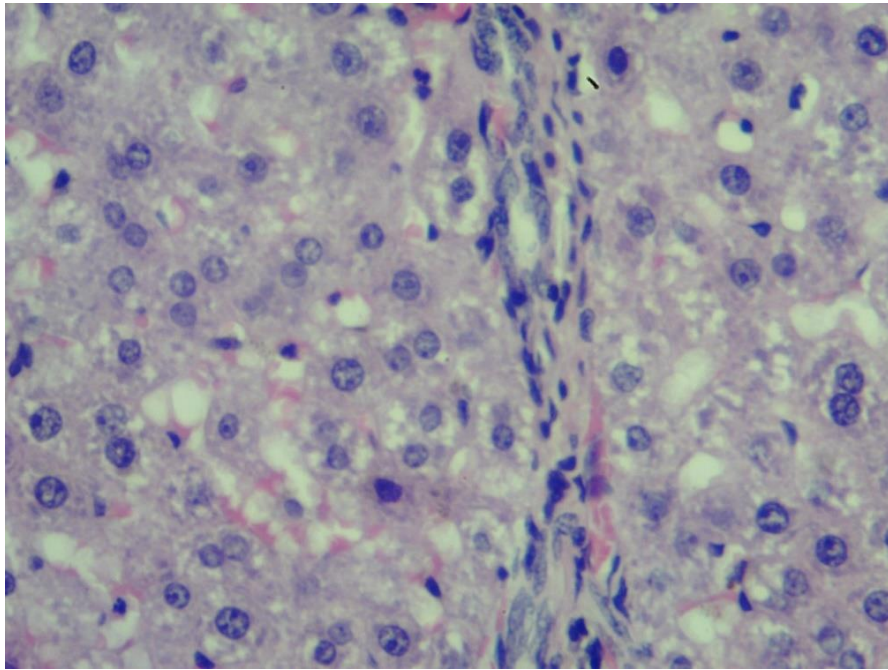


Рисунок 4.52 – Печінка тварини на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Повнокров'я синусоїдів, виражені дистрофічні зміни в гепатоцитах. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

В нирках визначались повнокров'я судин клубочка, при цьому ендотеліоцити не зазнавали суттєвих змін (рис. 4.53). Розміри клубочків дещо збільшувались, просвіти капсул практично не візуалізувались, нефротелій зовнішнього листа капсули не змінювався. В інтерстиції просвіти дрібних судин венозного русла залишались дещо розширеними, периваскулярний набряк не спостерігався. Просвіти більшості вивідних каналців залишались розширеними, окремі містили білкові детрити та поодинокі злущені епітеліоцити (рис. 4.53). В епітеліоцитах вивідних каналців цитоплазма клітин переважно залишалась однорідною; ядра візуалізувались у значній кількості клітин, розташовані базально. Міжклітинні контакти залишались збереженими, базальні мембрани збережені.

На 21-шу добу експерименту в легенях при корекції PRP виявлено значне стоншення міжальвеолярних перетинок, зниження кровонаповнення судин середнього калібру, зменшення набрякових проявів в стромі, зниження клітинної інфільтрації міжальвеолярних перетинок. Проте в бронхах

спостерігалась, хоча і значно менша, дистонія із вогнищевими спазмами стінок, місцями із десквамацією епітелію. В перибронхіальних зонах залишалась вогнищева лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, сформовані лімфоїдні інфільтрати (рис. 4.54). Мали місце еритростази в судинах дрібного калібру. Альвеоли залишались дещо розширеними, їх просвіти – вільними від ексудату.

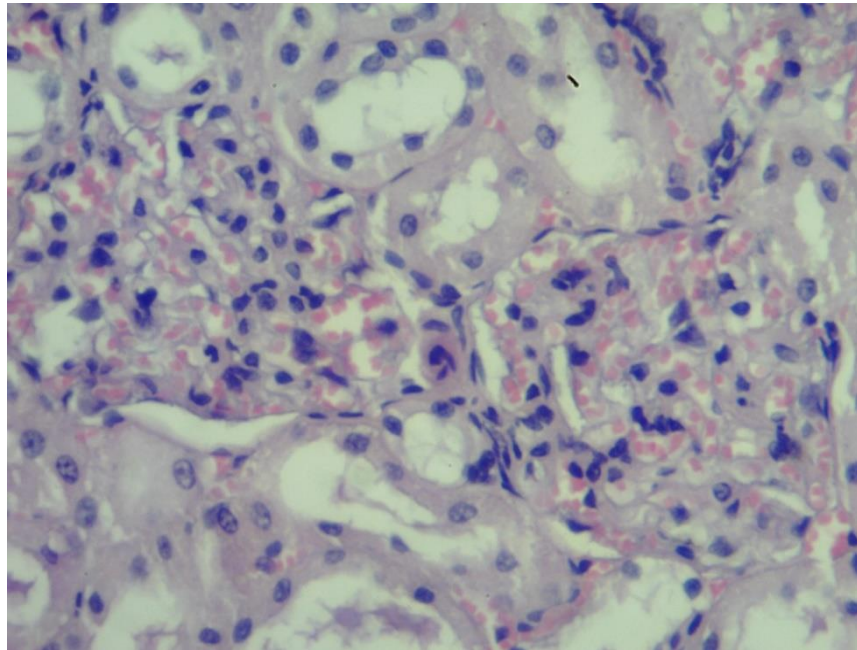


Рисунок 4.53 – Нирка тварини на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів. Збільшене кровонаповнення судин клубочка. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

При використанні МСК в легенях зменшувались прояви судинної проникності, що сприяло зменшенню клітинної інфільтрації стромі міжальвеолярних перетинок, просвіти альвеол залишались вільними, спазми в бронхіолах були вогнищевими.

Корекція PRP на 21-шу добу експерименту посилювала відновлення структури печінки. Хоча система портальної вени (центральна вена, синусоїди) залишались розширеними та помірно повнокровними спостерігалось відновлення балкової організації, відновлювались міжклітинні контакти, покращувалась структура самих гепатоцитів: різко зменшувались прояви

білкової дистрофії, цитоплазма ставала насиченою, гомогенною, збільшувалась кількість двоядерних гепатоцитів.

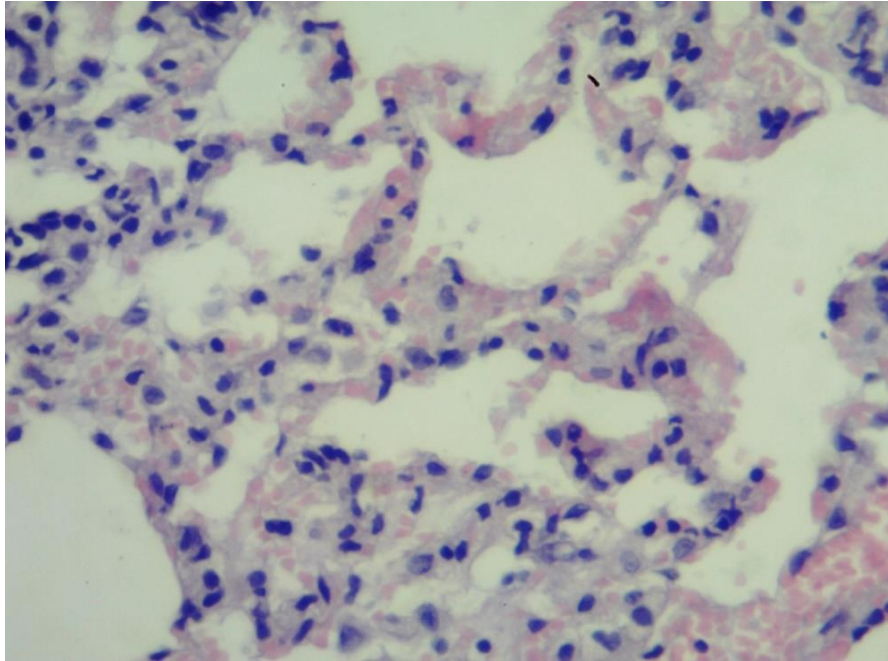


Рисунок 4.54 – Легеня тварини на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів з корекцією PRP. Повнокров'я судин мікроциркуляторного русла.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Площа портальних трактів дещо збільшувалась, за рахунок повнокров'я судин, посилення периваскулярної лімфо-плазмоцитарної інфільтрації, Дрібновогнищева ретикулоендотеліальна інфільтрація виявлялась переважно централобулярно і незначно по ходу розширених синусоїдів.

При корекції МСК балкова організація печінки залишалась збереженою, гепатоцити переважно централобулярних зон мали ознаки білкової дистрофії, в інших ділянках часточки залишались збереженими. Міжклітинні контакти не пошкоджувались, кровонаповнення було дещо нерівномірним (рис. 4.55).

Корекція PRP показала помірне кровонаповнення судин клубочка нирки та помірне кровонаповнення судин строми. Ендотелій судин клубочків та епітелій капсули залишались практично незміненими. Вивідні каналці залишались частково розширеними, в їх просвітах візуалізувались поодинокі

злуцені клітини епітелію. Переважна більшість епітелію залишалась збереженою, проте в частини візуалізувались помірні дистрофічні та дистрофічно-некротичні зміни.

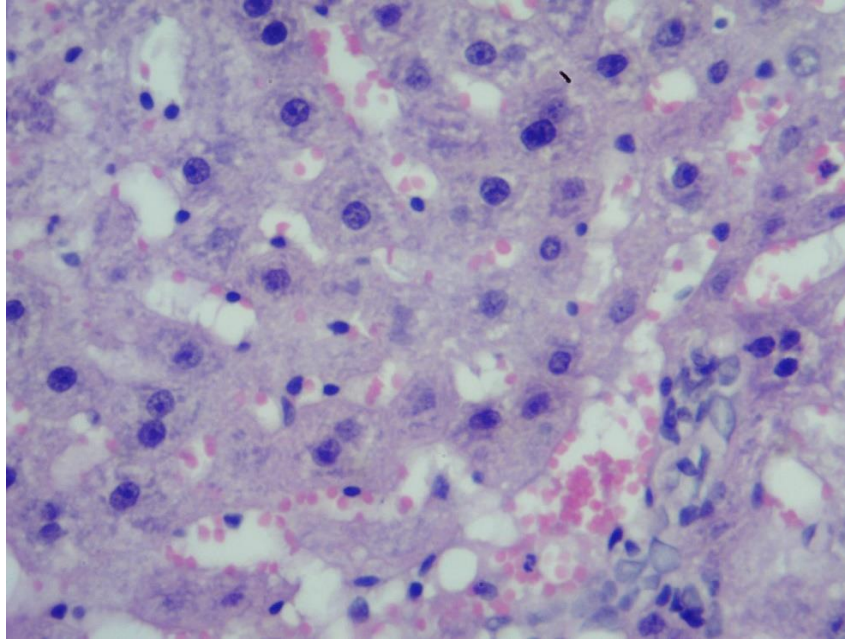


Рисунок 4.55 – Печінка тварини на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Збережена структура гепатоцитів та балкова організація. Незначне повнокров'я синусоїдів. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

У нирках корекція МСК різко зменшувала гіперемію строми (рис. 4.56). В кірковому шарі структура клубочків залишалась звичайною, кровонаповнення судин клубочків дещо збільшувалось. Ендотеліальні клітини артеріол не пошкоджувались, добре візуалізувались і клітини мезангіуму. Просвіти капсул практично не візуалізувались, нефротелій зовнішнього листа капсули практично не змінювався.

В інтерстиції просвіти дрібних судин венозного русла залишались дещо розширеними, проте периваскулярний набряк не спостерігався. Просвіти більшості вивідних канальців дещо розширювались, окремі містили білкові детрити та поодинокі злуцені епітеліоцити (рис. 4.56).

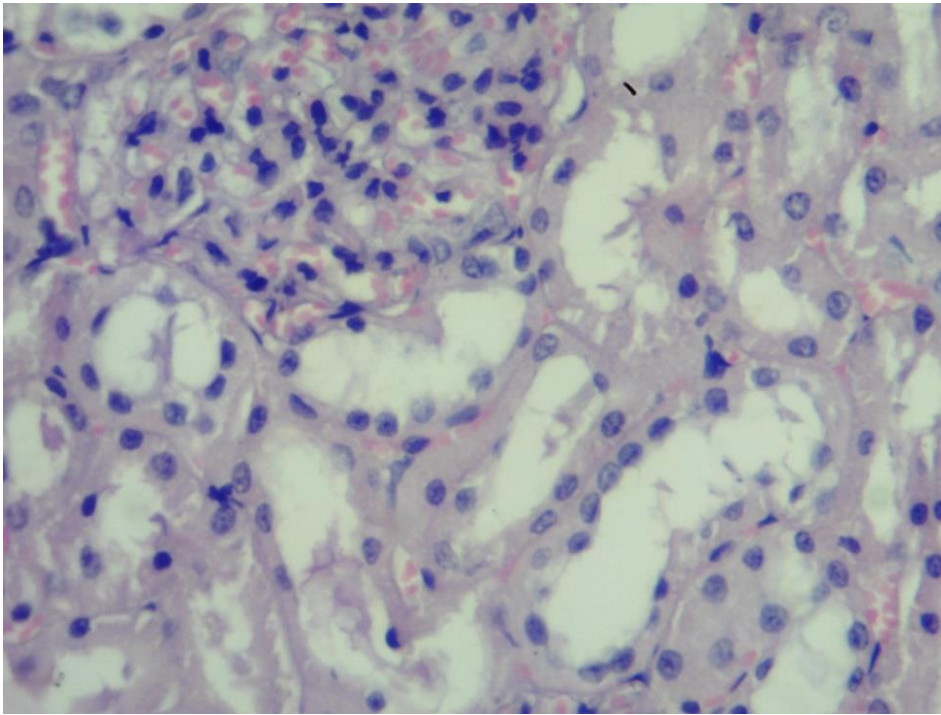


Рисунок 4.56 – Нирка тварини на 21-шу добу після травматичного ушкодження м'язів при корекції МСК. Часткове розширення вивідних каналців.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

В епітеліоцитах вивідних каналців цитоплазма клітин переважно була однорідною. Ядра візуалізувались у переважній більшості клітин, окремі ядра були гіперхромні, з наявністю ядерців, розташовані базально, міжклітинні контакти залишались збереженими, базальні мембрани збережені.

На основі наведених у розділі 4 результатів можна зробити такі проміжні висновки:

1. При моделюванні травматичного ушкодження м'язів встановлено, що на 1-шу добу експерименту у досліджуваних нами органах розвиваються дистрофічні зміни в усіх епітеліальних компонентах, проте найбільш вираженими вони є в печінці та легенях.

2. В легенях наростали розлади кровообігу у поєднанні із помірною лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією стромы до 14-ої доби і дещо зменшувались до 21-ої доби. В печінці порушувалась часточкова структура, наростали виражені дистрофічні зміни переважно до 14-ої доби і дещо

зменшувались прояви до 21-ої доби. В нирках наростали розлади кровообігу як в кірковому так і в мозковому шарі, виникали дистрофічні зміни епітелію вивідних каналців.

3. Застосування PRP та МСК має в різній мірі протекторний ефект уже із 1-ої доби застосування.

4. Застосування PRP проявляє переважно місцевий для корекції загоєння травматичного ушкодження м'язів, покращує відновлення структур в ділянці рани та має поверхневий вплив на відновлення епітеліального компоненту паренхіматозних органах, переважно у віддалені періоди.

5. Кращі показники відновлення м'язових волокон у групі тварин, яким проводилась корекція PRP на 14 та 21-шу добу експерименту за рахунок зменшення кількості пошкоджених волокон, збільшення кількості регенеруючих волокон, зменшення проявів запальної реакції, набряку та ущільнення колагенової строми в ділянці пошкодження.

6. Застосування МСК проявляє більш загальний протекторний вплив на структуру пошкоджених переважно епітеліальних структур паренхіматозних органів.

Наведені в розділі результати опубліковано у наукових працях автора [6, 31, 33, 37, 62].

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ОКИСНЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ, СИСТЕМИ ПРОТЕЇНАЗИ/ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНАЗ І ПОКАЗНИКІВ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ У ТВАРИН З ТРАВМАТИЧНИМ УШКОДЖЕННЯМ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ ТА ЗА ДІЇ КОРИГУЮЧИХ ЧИННИКІВ

Для оцінки впливу травматичного ушкодження м'язів та коригуючої терапії нами проведено співставлення показників крові експериментальних тварин, в посттравматичному періоді без корекції та після проведення корекції збагаченою тромбоцитами плазмою та мезенхімальними стовбуровими клітинами. Для реалізації даної мети нами проведено вивчення редокс системи, маркерів ендогенної інтоксикації, особливості цитокінового профілю, вираженості змін стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ у експериментальних тварин.

5.1 Особливості процесів ліпідної пероксидації у тварин з травматичним ушкодженням м'язів та після проведення корекції.

Для оцінки порушень при травмі м'язів нами досліджувались показники перекисного окислення ліпідів: малоновий діальдегід, диєнові кон'юганти та антиоксидантної системи: супероксиддисмутаза, каталаза. В результаті проведеного аналізу виявлені відхилення досліджуваних показників у групі тварин із змодельованим травматичним ушкодженням м'язів від аналогічних показників інтактних тварин.

При травмі основним механізмом пошкодження є генерація активних форм кисню, які активують перекисне окислення ліпідів. Враховуючи недостатність системи антиоксидантного захисту відбувається системне пошкодження клітинних мембран внаслідок пероксидації їх ліпідного шару.

Аналізуючи дані таблиці 5.1, можна вважати, що в посттравматичному періоді показники перекисного окислення ліпідів зростали, так рівень МДА на

першу добу становив $(7,02 \pm 0,02)$ мкмоль/л, на сьому добу – $7,64 \pm 0,01$ мкмоль/л, що порівняно з інтактними зріс у 2,3 рази на першу добу та у 2,6 рази на 7-му добу, рівень ДК $-3,12 \pm 0,02$ ум.Од на першу добу, на 7-му добу– $4,32 \pm 0,02$ ум.од., що порівняно з інтактними зріс у 3,3 на 1-шу добу та у 5,1 на 7-му добу ($p < 0,05$). Реактивні форми кисню утворюються в скелетних м'язах при травматичне ушкодження м'язової тканини та знижують життєздатність клітин в місці ушкодження. Проведені нами досліджень виявили, що в ранньому посттравматичному періоді після травматичного ушкодження м'язів гіперактивація процесів вільнорадикального окиснення ліпідів виявляється вже на 1-шу добу та зростає до 7-ї доби посттравматичного періоду порівняно з інтактними (табл. 5.1)

Таблиця 5.1 – Активність малонового діальдегіду та диєнових кон'югант у тварин з травматичним ушкодженням м'язів ($M \pm m$).

Група		Показник	
		ДК ум.од	МДА мкмоль/л
Інтактні (n=12)		$0,97 \pm 0,01$	$3,14 \pm 0,01$
Перша група	1-ша доба (n=9)	$3,12 \pm 0,02^*$	$7,02 \pm 0,02^*$
	7-ма доба. (n=8)	$4,32 \pm 0,02^*$	$7,64 \pm 0,01^*$
	14-та доба. (n=8)	$4,01 \pm 0,02^*$	$5,63 \pm 0,04^*$
	21-ша доба (n=7)	$3,21 \pm 0,02^*$	$5,14 \pm 0,04^*$
Друга група	1-ша доба (n=9)	$3,09 \pm 0,02^*$	$6,91 \pm 0,02^*$
	7-ма доба (n=9)	$2,03 \pm 0,02^*$	$6,11 \pm 0,02^*$
	14-та доба (n=8)	$1,32 \pm 0,01^*$	$5,11 \pm 0,03^*$
	21-ша доба (n=8)	$1,02 \pm 0,01^*$	$3,92 \pm 0,03^*$
Третя група	1-ша доба (n=9)	$3,1 \pm 0,01^*$	$6,83 \pm 0,02^*$
	7-ма доба (n=9)	$3,81 \pm 0,01^*$	$5,26 \pm 0,02^*$
	14-та доба (n=8)	$3,15 \pm 0,02^*$	$4,34 \pm 0,03^*$
	21-ша доба (n=8)	$1,68 \pm 0,01^*$	$4,06 \pm 0,01^*$
Примітка. * – величини які статистично достовірно від аналогічних показників у контрольній групі тварин ($p < 0,05$).			

Аналізуючи показники перекисного окислення в пізньому посттравматичному періоді відмічаємо, що МДА знижується на 26,3 % на 14-ту добу порівняно з сьомою добою та на 21-шу добу не досягали показників інтактних, проте ці показники є достовірно вищі контролю (див. табл. 5.1)

При травматичному ушкодженні м'язів активність показників антиоксидантної системи знижується починаючи з першої доби. М'язові волокна містять як ферментативні, так і неферментативні антиоксиданти, які працюють як складна одиниця для регулювання активних форм кисню. Усередині клітини ці антиоксиданти стратегічно розподіляються по всій цитоплазмі та в різних органелах. Більше того, ферментативні та неферментативні антиоксиданти існують як у позаклітинному, так і в судинному просторі. У сукупності ці антиоксиданти захищають м'язові волокна від окисних ушкоджень у періоди підвищеного вироблення окислювачів. Міогенні клітини забезпечені антиоксидантними ферментами, такими як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза. Ці ферменти не тільки нейтралізують надмірну ПОЛ, але й впливають на міогенну регенерацію.

Ми вивчали активність супероксиддисмутази, оскільки СОД утворює першу лінію захисту від супероксидних радикалів та демутує супероксидні радикали з утворенням пероксиду водню (H^2O^2) та кисню (O^1).

Нами встановлено, що рівень СОД знижується починаючи з першої доби посттравматичного періоду в 1,5 рази, на 7– 1,6 рази та має тенденцію до зростання починаючи з 14-ої доби, проте рівень СОД на 14-ту добу – в 1,3 рази та на 21– в 1,2 рази є нижчим за показники інтактних (табл. 5.2).

Каталаза – це гемозалежний фермент, локалізований у пероксисомах, який каталізує розпад H^2O^2 до H^2O та O^2 з надзвичайно високою швидкістю [3].

Так рівень КТ зростає починаючи з першої доби посттравматичного періоду в 1,8 рази, на 7 – в 1,7 рази та має тенденцію до зниження починаючи з 14-ої доби, рівень даного ферменту на 14-ту добу – в 1,2 рази вищий за показники інтактних (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Активність показників антиоксидантної системи у тварин з травматичним ушкодженням м'язів ($M \pm m$)

Група		Показник	
		СОД. ум. од.	Каталаза мкат/л
Інтактні (n=12)		$3,14 \pm 0,01$	$4,77 \pm 0,01$
Перша група (n=40)	1-ша доба (n=9)	$2,14 \pm 0,02^*$	$8,70 \pm 0,02^*$
	7-ма доба. (n=8)	$2,01 \pm 0,02^*$	$7,96 \pm 0,02^*$
	14-та доба. (n=8)	$2,35 \pm 0,02^*$	$5,68 \pm 0,02^*$
	21-ша доба (n=7)	$2,45 \pm 0,02^*$	$4,87 \pm 0,02^*$
Друга група (n=40)	1-ша доба (n=9)	$2,76 \pm 0,02^*$	$9,82 \pm 0,02^*$
	7-ма доба (n=9)	$2,54 \pm 0,02^*$	$7,41 \pm 0,02^*$
	14-та доба (n=8)	$2,98 \pm 0,02^*$	$5,90 \pm 0,02^*$
	21-ша доба (n=8)	$3,05 \pm 0,02^*$	$4,94 \pm 0,02^*$
Третя група (n=40)	1-ша доба (n=9)	$2,58 \pm 0,02^*$	$9,87 \pm 0,02^*$
	7-ма доба (n=9)	$2,46 \pm 0,02^*$	$7,94 \pm 0,02^*$
	14-та доба (n=8)	$3,03 \pm 0,02^*$	$5,34 \pm 0,02^*$
	21-ша доба (n=8)	$3,31 \pm 0,02^*$	$4,67 \pm 0,02^*$
Примітка. * – величини які статистично достовірно від аналогічних показників у контрольній групі тварин ($p < 0,05$).			

За літературними даними зрілі клітини скелетних м'язів, а також міогенні стовбурові та клітини-попередники оснащені складними ферментативними антиоксидантними системами, що робить їх надзвичайно життєздатними у відповідь на зміни в окисно-відновних середовищах [108, 153].

Рівень АПІ, який вказує на наявний баланс прооксидантних і антиоксидантних механізмів, на 1-шу добу посттравматичного періоду становив 1,23, на 7-му – 1,04, а в інтактних – 1,52, не нормалізувався у групі піддослідних тварин до кінця часу проведення експерименту. Такі результати

вказують на те, що травматичне ушкодження м'язів викликає тривалі системні зміни та дисбаланс адаптаційно-компенсаторних механізмів, спрямованих на ліквідацію патологічних чинників

Отже, оксидативний стрес, що розвивається при травмах, супроводжується гіперпродукуванням вільних радикалів на фоні виснаження ендогенних антиоксидантних резервів.

Проте активні форми кисню є незамінними виконавцями та модуляторами дегенеративно-запальної фази під час регенерації скелетних м'язів. Хоча цей процес є необхідним для успішного відновлення м'язів, а активні форми кисню, що генеруються в безпосередній близькості від м'язових клітин, активують сигнальні шляхи, що мають відношення до регенерації м'язів, окислювальний стрес посилюється, це також може призвести до вторинного пошкодження раніше не пошкоджених волокон. Тому актуальним є пошук шляхів корекції травматичного ушкодження м'язів.

За умови корекції збагаченої тромбоцитами плазми крові травматичного ушкодження м'язів виявлено суттєве покращення у значенні досліджуваних показників порівняно з аналогічними показниками у тварин, яким корекцію не проводили

Аналізуючи дані таблиці 5.1, можна вважати, що корекція PRP позитивно впливає на динаміку продуктів тіобарбітурової кислоти вже з 1-ої доби спостереження, так показник ДК на 1-шу добу спостереження суттєво не відрізнявся від аналогічного показника тварин, яким корекцію не проводили, проте на 7-му добу склав 47,0 % від показника тварин без корекції, на 14-ту – 32,9 %, а на 21-шу – 31,8 %, достовірно не перевищуючи рівень тварин без змодельованої патології (105,1 %). Концентрація МДА у тварин, яким проводили корекцію, також знижувалась, проте дещо менше, ніж рівень ДК: на 1-шу добу це зниження було не достовірним, однак на 7-му показник склав 79,9 %, 14-ту – 90,7 %, 21-шу – 76,3 % від рівня тварин, яким корекції не проводили., (табл. 5.1, рис. 5.1) За умов експериментальної корекції з

використанням PRP відбувається пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що веде до зниження рівня продуктів ПОЛ.



Рисунок 5.1 – Динаміка активності малонового діальдигіду у тварин з травматичним ушкодженням м'язів в залежності від методу корекції

За даними таблиці 5.2, активність СОД на першу добу склала ($2,76 \pm 0,02$) ум.од., що склало 128,9 % показника першої групи, та на сьому добу склав 126,0 % показника першої групи, де корекцію не проводили. Отже, призначення PRP призводить до зростання активності ферментів антиоксидантної системи. На нашу думку, корекція м'язової травми PRP на першу добу посттравматичного періоду, супроводжувалась зменшенням оксидативного ушкодження міоцитів (табл. 5.2, рис. 5.2).

Аналізуючи динаміку змін показника АПІ було встановлено (рис. 5.1), що у групі тварин з м'язовою травмою, яким корекцію не проводили на 1-шу добу він був меншим на 19,1 %, на 7-му добу – на 31,6 % ($p < 0,05$), на 14-ту добу на 33,6 % ($p < 0,05$) та на 21-шу – на 38,2 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами без змодельованої патології. У групі тварин, яким проводили корекцію з використанням PRP показник АПІ на 1-шу добу зріс на 15,4 % ($p < 0,05$), на 7-му

добу – на 16,3 % ($p < 0,05$), 14-ту – на 14,9 % а на 21-шу – на 34,0 % порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили (табл. 5.3, рис. 5, 3). А в групі тварин, яким проводили корекцію МСК, показник АПІ на 1-шу добу зріс на 15,4 % ($p < 0,05$), на 7-му добу – на 16,3 % ($p < 0,05$), 14-ту – на 14,9 % а на 21-шу – на 34,0 % порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили (табл. 5.3, рис. 5, 3).

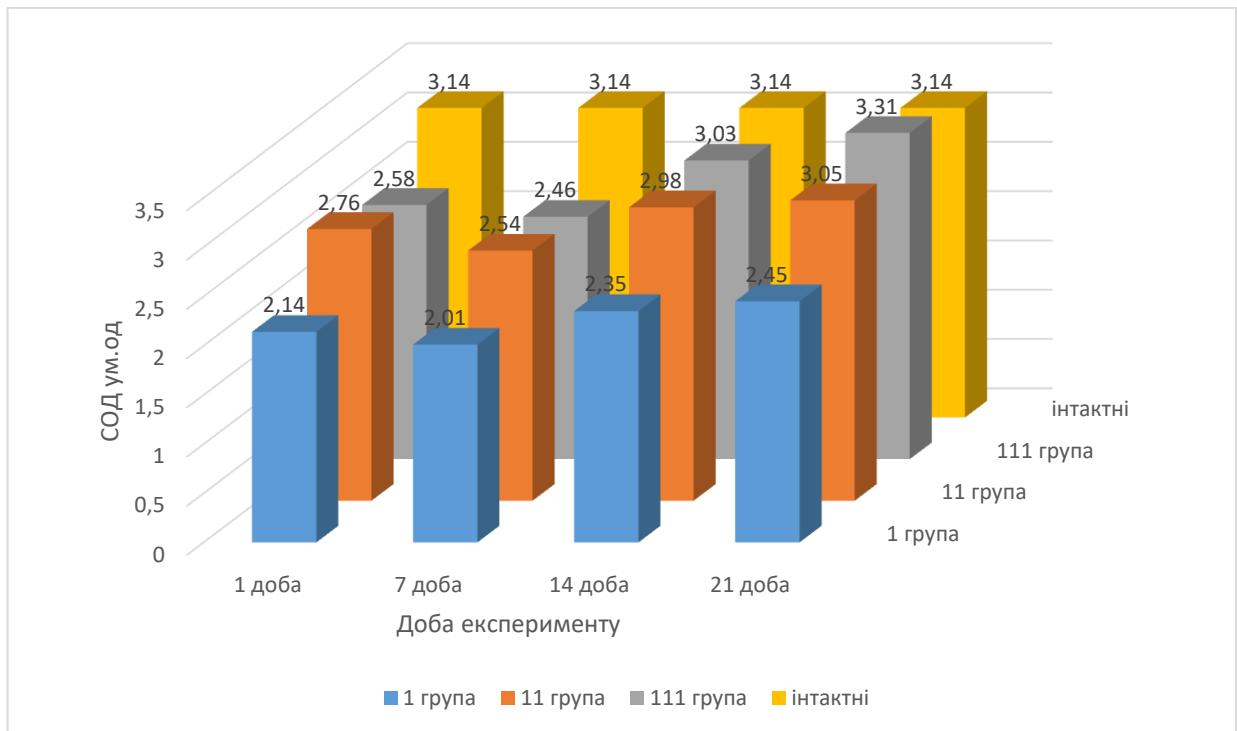


Рисунок 5.2 – Динаміка СОД у тварин із травматичним ушкодженням м'язів залежно від методів корекції

Ці показники свідчать, що за умов корекції PRP в експерименті відбувається пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що веде до зниження рівня продуктів ПОЛ (табл. 5.1, рис. 5.1)

Більше того, PRP знизив рівень активності каталази в травмованій м'язі. На нашу думку, корекція м'язової травми збагаченою тромбоцитами плазмою на першу добу посттравматичного періоду, зменшувала окислювальне ушкодження міоцитів, зменшувала посттравматичну запальну реакцію, і опосередковано посилювала життєздатність і проліферацію клітин м'язових супутників та міобластів та впливала на їх диференціацію. Нарешті,

антиоксидантні ферменти також регулюють процеси, що супроводжують регенерацію м'язів – індукують ангіогенез та зменшують фіброз.

Таблиця 5.3 Динаміка антиоксидантно-прооксидантного індексу при травматичному ушкодженні м'язів в залежності від методів корекції

Групи		Показник		
		Каталаза мкат/л	МДА мкмоль/л	АПІ
Інтактні (n=12)		4,77 ± 0,01	3,14 ± 0,01	1,52
Перша група (n=40)	1-ша доба (n=9)	8,70 ± 0,02*	7,02 ± 0,02*	1,23
	7-ма доба. (n=8)	7,96 ± 0,02*	7,64 ± 0,01*	1,04
	14-та доба. (n=8)	5,68 ± 0,02*	5,63 ± 0,04*	1,01
	21-ша доба (n=7)	4,87 ± 0,02*	5,14 ± 0,04*	0,94
Друга група (n=40)	1-ша доба (n=9)	9,82 ± 0,02*	6,91 ± 0,02*	1,42
	7-ма доба (n=9)	7,41 ± 0,02*	6,11 ± 0,02*	1,21
	14-та доба (n=8)	5,90 ± 0,02*	5,11 ± 0,03*	1,16
	21-ша доба (n=8)	4,94 ± 0,02*	3,92 ± 0,03*	1,26
Третя група (n=40)	1-ша доба (n=9)	9,87 ± 0,02*	6,83 ± 0,02*	1,45
	7-ма доба (n=9)	7,94 ± 0,02*	5,26 ± 0,02*	1,50
	14-та доба (n=8)	5,34 ± 0,02*	4,34 ± 0,03*	1,23
	21-ша доба (n=8)	4,67 ± 0,02*	4,06 ± 0,01*	1,15
Примітка. * – величини які статистично достовірно від аналогічних показників у контрольній групі тварин (p < 0,05).				

Аналізуючи дані таблиці 5.1, можна вважати, що корекція МСК позитивно впливає на динаміку перекисного окислення ліпідів вже з 1-ої доби спостереження,

Показник ДК на 1-шу добу спостереження суттєво не відрізнявся від аналогічного показника тварин, яким корекцію не проводили, проте на 7-му добу склав $3,81 \pm 0,01$ ум.од., а групі тварин без корекції – $4,32 \pm 0,02$ ум.од.-,

на 14-ту – $3,15 \pm 0,02$ ум.од., а групі тварин без корекції – $4,01 \pm 0,02$ ум.од а на 21-шу – $1,68 \pm 0,01$ ум.од, а групі тварин без корекції – $3,21 \pm 0,02$ %, а в групі інтактних – $0,97 \pm 0,01$ ум.од. (табл. 5.1, рис. 5.1) За умов експериментальної корекції з використанням МСК відбувається пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що веде до зниження рівня продуктів ПОЛ.

За даними таблиці 5.2, активність СОД на першу добу склала ($2,58 \pm 0,02$) ум.од., що склало 128,9 % показника першої групи, та на сьому добу склав ($2,46 \pm 0,02$) ум.од.-126 % показника першої групи, де корекцію не проводили. Отже, призначення МСК призводить до зростання активності ферментів антиоксидантної системи. На нашу думку, корекція м'язової травми МСК на першу добу посттравматичного періоду, супроводжувалась зменшенням оксидативного ушкодження міоцитів (табл. 5.2, рис. 5, 2).

Аналізуючи динаміку змін показника АПІ у дослідних групах, встановлено (табл. 5.3, рис. 5.3), що у першій дослідній групі на 7-му добу він перевищував рівень через 1-ої доби на 30,2 % ($p < 0,05$), на 14-ту добу його рівень знижувався на 15,5 % ($p < 0,05$) порівняно з 7-ою добою. У другій групі показник АПІ через сім діб зріс на 13,6 % ($p < 0,05$) відносно рівня на 3 добу. На 14-ту добу рівень показника АПІ знижувався відносно рівня на 7-му добу на 13,5 % ($p < 0,05$). Аналізуючи динаміку змін показника АПІ було встановлено (рис. 5.1), що у групі тварин з м'язовою травмою, яким корекцію не проводили на 1-шу добу він був меншим на 19,1 %, на 7-му добу – на 31,6 % ($p < 0,05$), на 14-ту добу на 33,6 % ($p < 0,05$) та на 21-шу – на 38,2 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами без змодельованої патології. У групі тварин, яким проводили корекцію з використанням PRP показник АПІ на 1-шу добу зріс на 13,4 % ($p < 0,05$), на 7-му добу – на 14,4 % ($p < 0,05$), 14-ту – на 12,9 % а на 21-шу – на 25,4 % порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили. У групі тварин, яким проводили корекцію з використанням МСК показник АПІ на 1-шу добу зріс на 15,2 % ($p < 0,05$), на 7-му добу – на 30,6 % ($p < 0,05$), 14-ту – на 15,8 % а на 21-шу – на 18,2 % порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили (табл. 5.3, рис. 5.3).

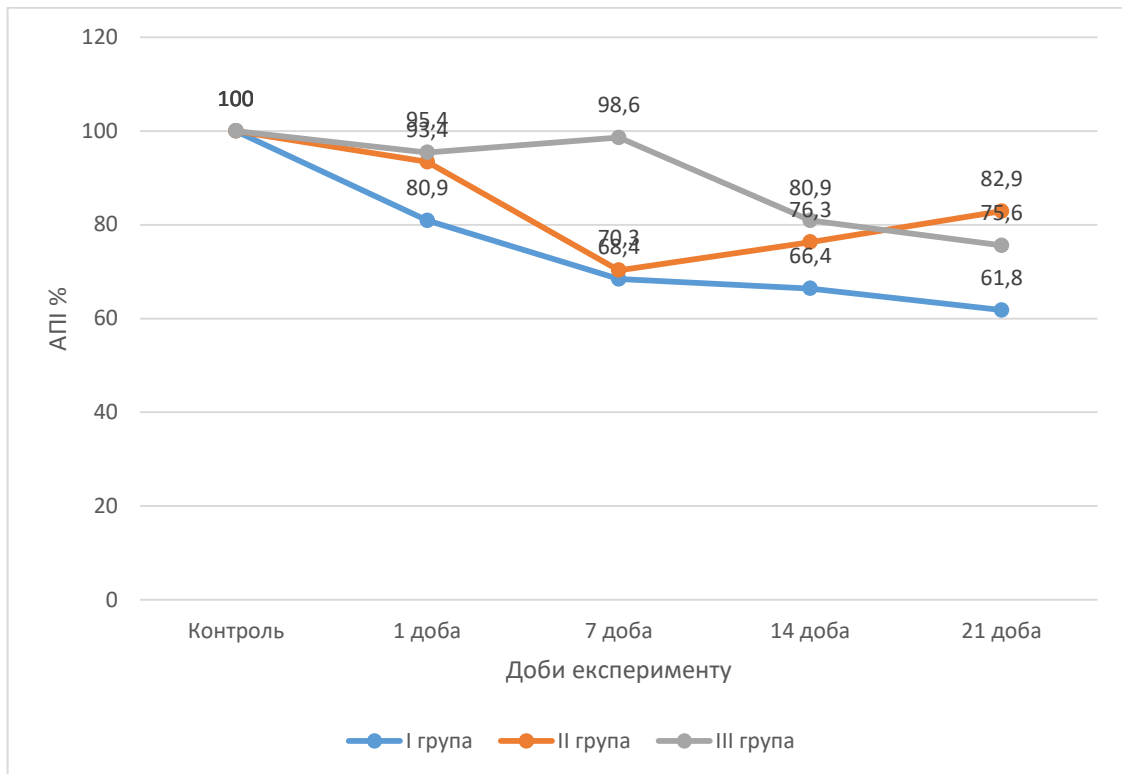


Рисунок 5.3 – Динаміка вмісту АПІ в сироватці крові (у відсотках від рівня контролю)

У першій групі рівень АПІ, який вказує на баланс прооксидантних та антиоксидантних механізмів, не нормалізувався до кінця експерименту.

У другій групі збагачена тромбоцитами плазма крові зменшує оксидативний стрес і має тенденцію до нормалізації співвідношення між оксидантною та прооксидантною системами.

У третій групі МСК позитивно впливають на нормалізацію співвідношення між оксидантною та прооксидантною системами.

Таким чином, отримані результати свідчать про розвиток значного дисбалансу прооксидантних і антиоксидантних механізмів, про що свідчить динаміка вмісту антиоксидантно-прооксидантного індексу, який до 21-ої доби спостереження зростав у першій групі, а в групі де призначали PRP та МСК він зменшувався та наближався до контролю.

5.2 Зміни показників ендогенної інтоксикації у тварин при травматичному ушкодженні м'язів та проведенні корекції

Як показали отримані нами результати (табл. 5.4, рис. 5.4), при травматичному ушкодженні м'язів показники МСМ1 та МСМ2, які відображали, відповідно, вміст ланцюгових і ароматичних амінокислот у середньомолекулярних пептидах та продуктах їх розпаду, були підвищені на 1-шу добу після нанесення травми. Так, вміст МСМ1 в крові уражених щурів на першу добу посттравматичного періоду зріс у 2,3 рази, а вміст МСМ2 в крові щурів збільшився відповідно у 2,8 рази порівняно з інтактними тваринами. (табл. 5.4, рис. 5.5).

Таблиця 5.4 – Динаміка вмісту МСМ у в сироватці крові щурів після травматичного ушкодження м'язів ($M \pm m$) (n=10)

Показ-ники	Групи тварин				
	Інтактні	Терміни спостереження			
		1-ша доба	7-ма доба	14-та доба	21-ша доба
МСМ1, ум.од.	0,250 ± 0,014	0,575 ± 0,031*	0,514 ± 0,026*	0,414 ± 0,026*	0,341 ± 0,026*
МСМ2, ум.од.	0,173 ± 0,001	0,484 ± 0,011*	0,450 ± 0,021*	0,350 ± 0,021*	0,270 ± 0,021*
Кс (МСМ2/ МСМ 1)	0,692	0,841 *	0,875 *	0,845 *	0,791

Примітка. * – $p < 0,05$ – вірогідні відмінності порівняно з тваринами контрольної групи.

Отже спостерігали виражені зміни щодо вмісту обох фракцій МСМ через добу з моменту травми. Через сім днів після травми спостерігалась незначна тенденція до зменшення вмісту МСМ, так МСМ1 склав 89,4 %, МСМ2– 92,9 % відповідного показника першої доби, на 14-ту добу МСМ1 склав 80,5 %,

МСМ2– 77,8 % відповідного показника сьомої доби, а на 21-шу добу МСМ1 склав 82,4 %, МСМ2– 77,1 % відповідного показника чотирнадцятої доби. Проте показники обох фракцій МСМ до 21-ої доби посттравматичного періоду залишалися вищими за показники інтактних, так МСМ1 у 1,4 рази, а МСМ2 у 1,1 рази (табл. 5.4, рис. 5.5).

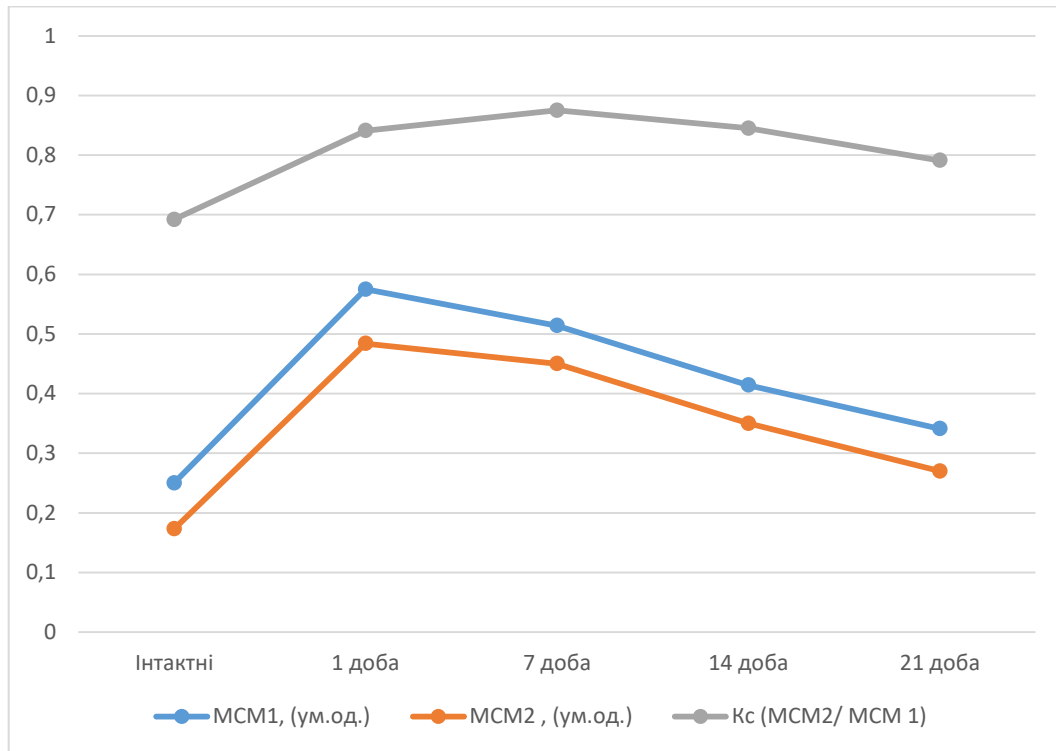


Рисунок 5.4 – Динаміка вмісту МСМ у в сироватці крові щурів після травматичного ушкодження м'язів

Таким чином, під впливом травми відмічалось збільшення концентрації в крові як МСМ1, так і МСМ2. Причому, зростання МСМ було значнішим для пулу МСМ2, що вказує на виражене збільшення ароматичних амінокислот у складі фракції середніх молекул. Оскільки МСМ – маркери ендотоксикозу, то різке зростання їх вмісту вказує на пік розвитку та генералізації синдрому. Інтоксикаційний синдром спричинений травмою супроводжується і спричиняє підвищений розпад тканин, посилення катаболічних процесів, внаслідок накопичення надлишкової кількості біологічно активних речовин, деформованих білкових метаболітів та інших токсичних речовин ендogenous. Збільшення Кс (МСМ2/ МСМ 1) у групі тварин порівняно з показниками

здорових, вказує на зростання ароматичних амінокислот у складі пептидних компонентів середньомолекулярних пептидів.

Встановлено, що в ході експерименту змінювався вміст МСМ2, МСМ1 в крові щурів залежно від методу корекції. В групі тварин, яким проведена корекція збагаченою тромбоцитами плазмою, виявлено виражені зміни щодо вмісту обох фракцій МСМ вже з першої доби посттравматичного періоду. Вміст МСМ1 в другій групі на першу добу склав 98,1 % від показника першої групи, де корекція не проводилась. На 7-му добу після травми спостерігалось зменшення вмісту МСМ1 – 86,7 % порівняно з першою добою, на 14-ту добу МСМ1 склав 81,7 %, порівняно з 7-ою добою, а на 21-шу добу МСМ1 склав 75,2 % відповідного показника чотирнадцятої доби. На першу добу МСМ2 склав 98,9 % від показника першої групи, де корекція не проводилась, на 7-му добу після травми спостерігалось зменшення вмісту МСМ2 – 83,5 % порівняно з першою добою, на 14-ту добу МСМ2 склав 75,2 %, порівняно з 7-ою добою, а на 21-шу добу МСМ2 склав 73,4 % відповідного показника чотирнадцятої доби. Проте показники обох фракцій МСМ до 21-ої доби посттравматичного періоду були достовірно нижчими за показники першої групи, де корекція не проводилась. (табл. 5.5, рис. 5.5).

В третій групі тварин, яким проводилась корекція МСК виражені зміни щодо вмісту обох фракцій МСМ спостерігали через добу з моменту травми. На першу добу МСМ1 склав 98,9 % від показника першої групи, де корекція не проводилась, МСМ2 – 97,3 %. Через сім днів після травми спостерігалась незначна тенденція до зменшення вмісту МСМ. Так МСМ1 склав 93,5 %, МСМ2 – 88,2 % відповідного показника першої групи. На 14-ту добу МСМ1 склав 95,6 %, МСМ2 – 88,8 % відповідного показника першої групи, а на 21-шу добу МСМ1 склав 86,8 %, МСМ2 – 78,5 % відповідного показника першої групи. (табл. 5.5, рис. 5.5, рис. 5.6).

Підвищення вмісту МСМ1, до складу яких можуть входити олігопептиди, фрагменти нуклеїнових кислот, вищих жирних кислот, триацилгліцеролів, свідчить про порушення структури мембран гепатоцитів, а МСМ2,

компонентами яких можуть бути пуринові основи, сечова кислота, та ароматичні амінокислоти – про пригнічення детоксикуючої функцій печінки та деструктивні зміни в м'язовій тканині.

Таблиця 5.5 – Динаміка вмісту МСМ у в сироватці крові щурів після травматичного ушкодження м'язів в залежності від корекції (М ± m)

Група		Показник		
		МСМ1, ум.од.	МСМ2, ум.од.	Кс (МСМ2/МСМ 1)
Інтактні (n=12)		0,250 ± 0,014	0,173 ± 0,001	0,692 ± 0,01
Перша група (n=40)	1-ша доба (n=9)	0,575 ± 0,031*	0,484 ± 0,011*	0,841 *
	7-ма доба. (n=8)	0,514 ± 0,026*	0,450 ± 0,021*	0,875 *
	14-та доба. (n=8)	0,414 ± 0,026*	0,350 ± 0,021*	0,845 *
	21-ша доба (n=7)	0,341 ± 0,026	0,270 ± 0,6021*	0,791
Друга група (n=40)	1-ша доба (n=9)	0,564 ± 0,029*	0,479 ± 0,011*	0,849
	7-ма доба (n=9)	0,489 ± 0,026*	0,400 ± 0,021*	0,817
	14-та доба (n=8)	0,400 ± 0,026*	0,301 ± 0,021*	0,753
	21-ша доба (n=8)	0,301 ± 0,026	0,221 ± 0,021*	0,734
Третя група (n=40)	1-ша доба (n=9)	0,569 ± 0,031*	0,471 ± 0,011*	0,828
	7-ма доба (n=9)	0,481 ± 0,026*	0,397 ± 0,021*	0,825
	14-та доба (n=8)	0,396 ± 0,026*	0,311 ± 0,021*	0,785
	21-ша доба (n=8)	0,296 ± 0,026	0,212 ± 0,021*	0,716
Примітка. *величини які статистично достовірно від аналогічних показників у контрольній групі тварин (p < 0,05)				

Отже, накопичення МСМ є маркером ендотоксикозу, що відображає рівень патологічного білкового метаболізму. Синдром ендогенної інтоксикації (СЕІ) супроводжує гостру і хронічну патологію, але й сам є важливим фактором патогенезу, визначає перебіг та наслідки захворювання.

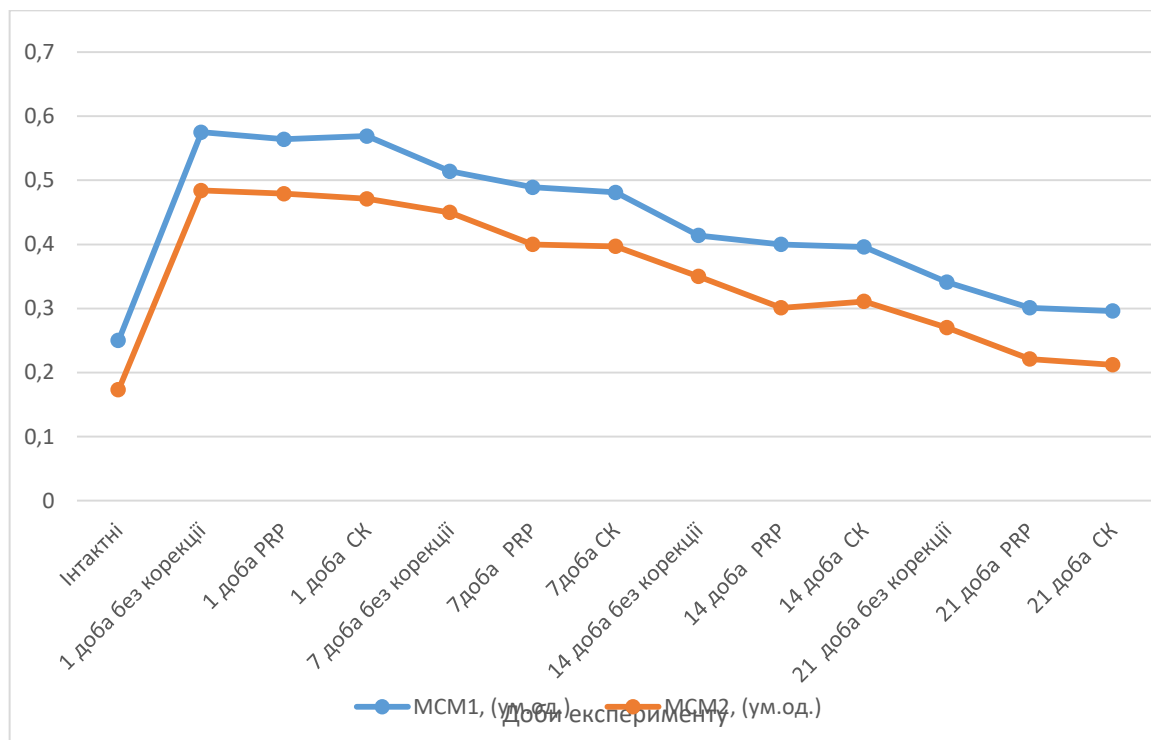


Рисунок 5.5 – Динаміка вмісту МСМ в сироватці крові щурів після травматичного ушкодження м'язів в залежності від корекції

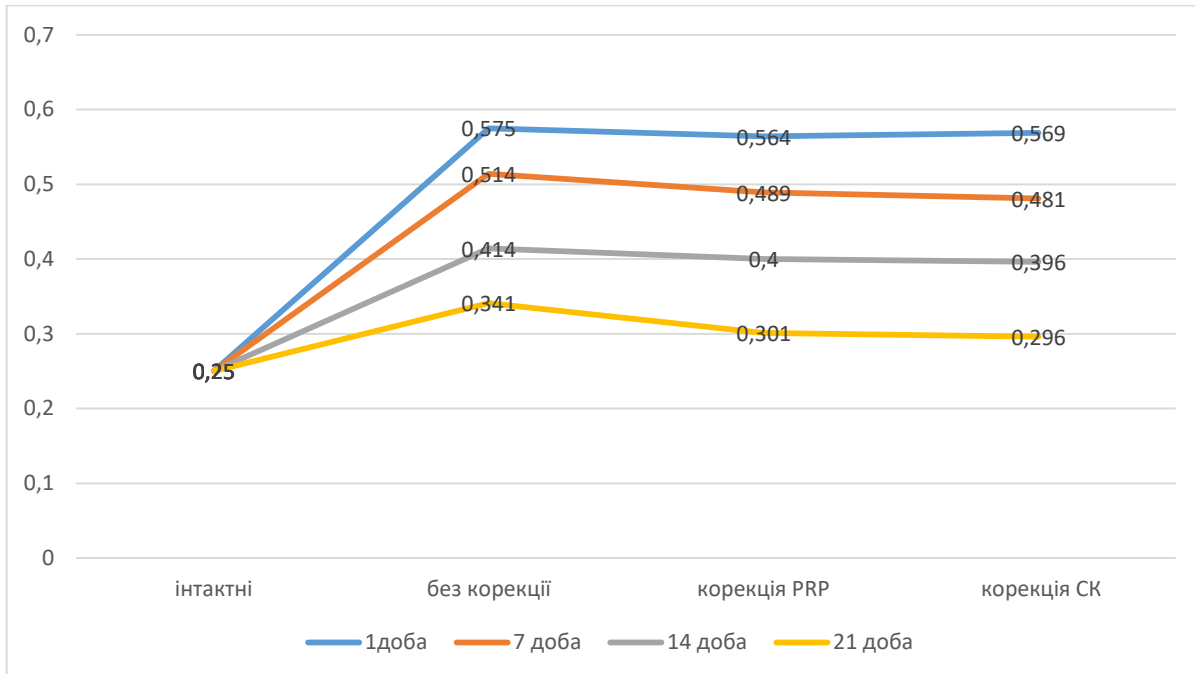


Рисунок 5.6 – Динаміка вмісту МСМ1 у сироватці крові щурів після травматичного ушкодження м'язів в залежності від корекції

Дані наших досліджень свідчать, що з зростання рівня МСМ в посттравматичному періоді, сумарний токсичний вплив на мембрани еритроцитів збільшувався, та проявлявся достовірним підвищенням ЕП у всі терміни спостереження.

На сьогодні виділяють три стадії розвитку синдрому системної запальної відповіді – стадію локальної продукції медіаторів у відповідь на травму, яку можна розцінити як захисну реакцію (загоєння ран, захист клітин організму від патогенних мікроорганізмів); стадію викиду малої кількості медіаторів у кровоток для підтримки гомеостазу; стадію генералізації запальної реакції, при якій регулюючі системи не здатні забезпечити гомеостаз організму. Вказані вище медіатори проявляють деструктивні функції, насамперед у системі ендотеліоцитів.

На першу добу ЕП у другій групі, де проводилась корекція збагаченою тромбоцитами плазмою крові склав 98,3 % від показника першої групи, де корекція не проводилась. На 7-му добу після травми ЕП склав 90,4 %, відповідного показника першої групи. На 14-ту добу ЕП склав 87,9 %, відповідного показника першої групи, а на 21-шу добу ЕП склав 86,4 %, відповідного показника першої групи. (табл. 5.6).

Аналізуючи дані таблиці 5.6 встановлено, що ЕП на першу добу у третій групі, де проводилась корекція МСК, склав $60,1 \pm 1,1$ %, що становило 96,7 % від показника першої групи, де корекція не проводилась. На 7-му добу після травми ЕП склав $68,5 \pm 8,0$ %, що становило 89,5 %, відповідного показника першої групи. На 14-ту добу ЕП склав 81,8 %, відповідного показника першої групи, а на 21-шу добу ЕП склав 84,1 %, відповідного показника першої групи. ($p < 0,05$).

Саме в них ступінь деструкції мембран еритроцитів (ступінь поглинання барвника) протягом експерименту був найвищим. Ці зміни, очевидно, викликані тим, що при дії травми на організм, порушується енергетичний обмін і транспорт речовин в еритроцитах, зростає проникність їх мембран та збільшується сорбційна здатність.

Таблиця 5.6 – Динаміка ЕП (%) у крові щурів після травматичного ушкодження м'язів в залежності від корекції (М ± m)

Група		Показник
		ЕП, %
Інтактні (n=12)		33,1 ± 3,8
Перша група	1-ша доба (n=9)	62,1 ± 1,1*
	7-ма доба. (n=8)	73,5 ± 8,0*
	14-та доба. (n=8)	49,72 ± 2,0*
	21-ша доба (n=7)	44,20 ± 1,0*
Друга група	1-ша доба (n=9)	61,1 ± 1,1*
	7-ма доба (n=9)	66,5 ± 8,0*
	14-та доба (n=8)	43,72 ± 2,0*
	21-ша доба (n=8)	38,20 ± 1,0*
Третя група	1-ша доба (n=9)	60,1 ± 1,1*
	7-ма доба (n=9)	68,5 ± 8,0*
	14-та доба (n=8)	40,72 ± 2,0*
	21-ша доба (n=8)	37,20 ± 1,0*
Примітка. * – p < 0,05 – вірогідні відмінності порівняно з тваринами контрольної групи.		

Базуючись на аналізі показників клітинного складу крові, розраховано ЛПІ на початку експерименту та в різні його терміни. У результаті проведеного дослідження встановлено неоднозначну реакцію лейкоцитарної відповіді на розвиток патологічних процесів уже через добу: ЛПІ у 2,7 рази (табл. 5.7).

За даними таблиці 5.7, ЛПІ за Я.Я. Кальф-Каліфом у модифікації Б.А. Рейса зростав і склав на першу добу посттравматичного періоду $0,67 \pm 0,01$ %, а на сьому добу $0,75 \pm 0,01$ %, а в контролі – $0,25 \pm 0,01$ %. Зростання даного показника може свідчити про активацію запальних реакцій в ділянці травматичного пошкодження м'язу та активації репаративних процесів.

На першу добу ЛПІ у другій групі, де проводилась корекція збагаченою тромбоцитами плазмою крові склав 95,5 % від показника першої групи, де

корекція не проводилась. На 7-му добу після травми ЛШ склав 76 %, відповідного показника першої групи. На 14-ту добу ЛШ склав 82,9 %, відповідного показника першої групи, а на 21-шу добу ЛШ склав 82,7 %, відповідного показника першої групи. ($p < 0,05$) (табл. 5.8, рис. 5.7)

Таблиця 5.7 – Динаміка ЛШ (%) у крові щурів після травматичного ушкодження м'язів ($M \pm m$)

Група		Показник
		ЛШ, %
Інтактні (n=12)		0,25 ± 0,02
Перша група	1-ша доба (n=9)	0,67 ± 0,01*
	7-ма доба. (n=8)	0,75 ± 0,01*
	14-та доба. (n=8)	0,41 ± 0,01*
	21-ша доба (n=7)	0,29 ± 0,01*
Примітка. * – $p < 0,05$ – вірогідні відмінності порівняно з тваринами контрольної групи.		

На першу добу ЛШ у третій групі, де проводилась корекція МСК, був більшим на 1,5 % від показника першої групи, де корекція не проводилась. На 7-му добу після травми ЛШ склав 82,6 %, відповідного показника першої групи. На 14-ту добу ЛШ склав 95,1 %, відповідного показника першої групи, а на 21-шу добу ЛШ склав 84,1 %, відповідного показника першої групи ($p < 0,05$) (табл. 5.8, рис. 5.8).

Отримані в результаті експериментального дослідження дані впливу травматичного ушкодження м'язу свідчать про те, що в результаті розвивається ендотоксикоз, свідченням чого є нагромадження ендотоксинів в організмі тварин, на що вказують виражені зміни показників ендогенної інтоксикації – еритроцитарного та лейкоцитарного індексів інтоксикації та вмісту молекул середньої маси.

Таблиця 5.8 – Динаміка ЛШ (%) у крові щурів після травматичного ушкодження м'язів в залежності від методу корекції($M \pm m$).

Група		Показник
		ЛШ, %
Інтактні (n=12)		0,25 ± 0,02
Перша група	1-ша доба (n=9)	0,67 ± 0,01*
	7-ма доба (n=8)	0,75 ± 0,01*
	14-та доба (n=8)	0,41 ± 0,01*
	21-ша доба (n=7)	0,29 ± 0,01*
Друга група	1-ша доба (n=9)	0,64 ± 0,01*
	7-ма доба (n=9)	0,57 ± 0,01*
	14-та доба (n=8)	0,34 ± 0,01*
	21-ша доба (n=8)	0,24 ± 0,01*
Третя група	1-ша доба (n=9)	0,68 ± 0,01*
	7-ма доба (n=9)	0,62 ± 0,01*
	14-та доба (n=8)	0,39 ± 0,01*
	21-ша доба (n=8)	0,29 ± 0,01*

Примітка. * – $p < 0,05$ – вірогідні відмінності порівняно з тваринами контрольної групи.

Однією із систем організму, яка зазнає значних змін при політравмі, є система детоксикації. Порушення функціонування цієї системи призводить до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації (CEI), який супроводжує захворювання і ускладнення, пов'язані з підвищеним розпадом тканин, посиленням процесів катаболізму, недостатністю функції внутрішніх органів. Маркерами ендогенної інтоксикації вважають молекули середньої маси, еритроцитарний індекс інтоксикації, які є доказовими та швидкими у виконанні.

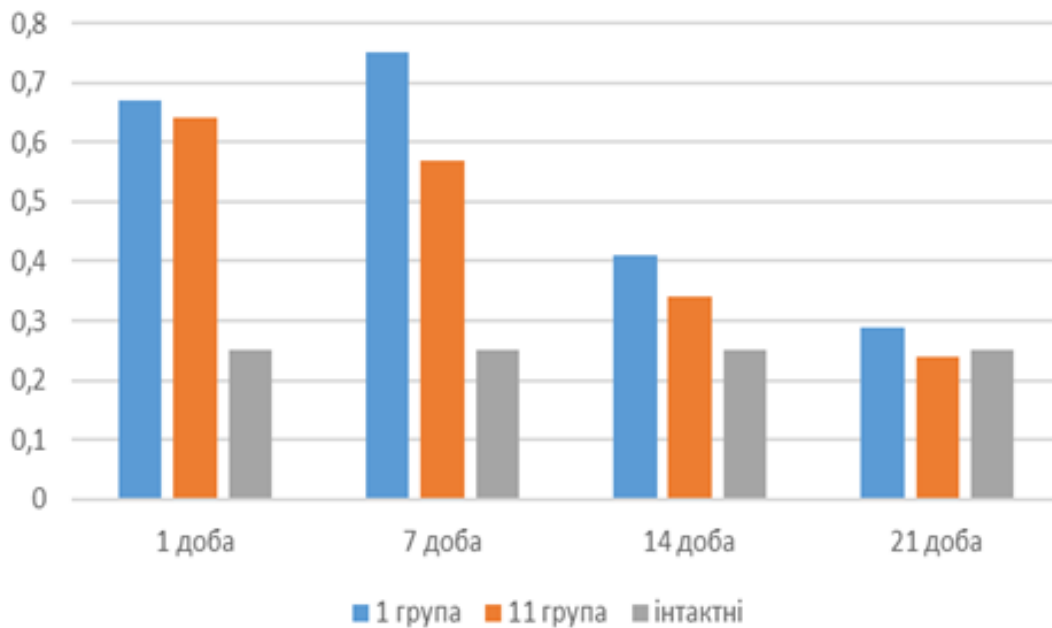


Рисунок 5.7 – Динаміка ЛПШ (%) в залежності від методу корекції травматичного ушкодження м'язів

5.3 Особливості цитокінового профілю у сироватці крові щурів з травматичним ушкодженням м'язів та після проведення корекції

Аналізуючи отримані результати, які представлені в таблиці 5.9, встановлено, що показники прозапальних цитокінів сироватки крові у щурів, яким моделювали травму м'язів, були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології. Так, концентрація ІЛ-1 β на 1-шу добу після нанесення травми була достовірно вищою від показника тварин без змодельованої патології у 2,4 рази, TNF- α – у 2,6, а ІЛ-6 – у 2,4 разів вищим, ніж у тварин, яким травми не моделювали. В обох випадках різниця між показниками була достовірною (табл. 5.9, рис. 5.8, 5.9).

На 7-му добу концентрація ІЛ1- β дещо знизилася, однак перевищувала рівень тварин без модельованої патології в 1,8 рази. Зміни показників TNF- α та ІЛ-6 мали аналогічну спрямованість і на 7-му добу від моменту нанесення

травми перевищували відповідно у 2,0 та 1,9 разів показники інтактних тварин. До 14-ої доби концентрація досліджуваних прозапальних цитокінів залишалася практично на тому ж рівні, що й у попередній термін спостереження, проте достовірно перевищували рівень показників інтактних: ІЛ1- β . – у 1,7рази, TNF- α – у 1,9 рази, ІЛ-6 – у рази 1,8 (табл. 5.9, рис. 5.8).

Таблиця 5.9 Динаміка показників цитокінового профілю сироватки крові щурів з м'язовою травмою ($M \pm m$)

Група тварин		Показник			
		ІЛ-1 β , пг/мл	TNF- α , пг/мл	ІЛ-6, пг/мл	ІЛ-10, пг/мл
Інтактні, n=12		5,20 \pm 0,16	4,64 \pm 0,23	4,40 \pm 0,14	11,50 \pm 0,29
Перша група	Перша доба (n=9)	12,37 \pm 0,25*	12,17 \pm 0,27*	10,41 \pm 0,18*	18,52 \pm 0,29*
	Сьома доба (n=8)	9,43 \pm 0,21*	9,38 \pm 0,23*	8,39 \pm 0,18*	11,31 \pm 0,28
	Чотирнадцята доба (n=8)	9,90 \pm 0,27*	8,93 \pm 0,18*	8,13 \pm 0,23*	7,80 \pm 0,29*
	Двадцять перша доба (n=7)	8,43 \pm 0,26*	6,69 \pm 0,24*	5,74 \pm 0,19*	8,01 \pm 0,18*
Примітка. * – зміни показників достовірні відносно інтактних ($p < 0,05$).					

До 21-ої доби концентрації досліджуваних прозапальних цитокінів сироватки крові зменшувались, проте були достовірно вищими від норми, зокрема, концентрація ІЛ1- β в 1,6 рази, TNF- α в 1,4 рази та ІЛ-6 в 1,3 рази (табл. 5.9; рис. 5.8, 5.9).

За умови травми м'язів руйнується цілісність плазматичної мембрани міоволокна та базальної пластинки, що веде до зростання в клітині рівня позаклітинного кальцію та у підсумку призводить до деградації м'язових білків

та некрозу. Клітини запалення, які сприяють очищенню та відновленню некротичної тканини, домінують у місцевій реакції на пошкодження. Ці клітини вивільняють розчинні молекули, головним чином цитокіни, які, як правило, функціонують як міжклітинні месенджери в аутокринному режимі, зв'язуючись із клітиною свого походження, або в паракринному режимі, зв'язуючись із рецепторами сусідньої клітини-мішені.

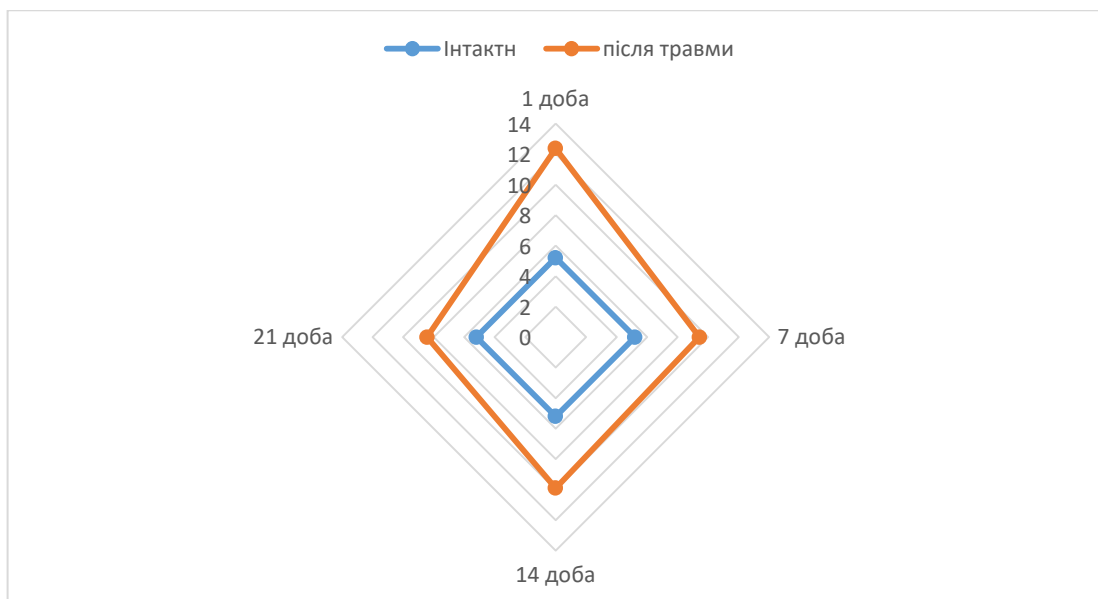


Рисунок 5.8 – Динаміка IL-1 β після травматичного ушкодження м'язів

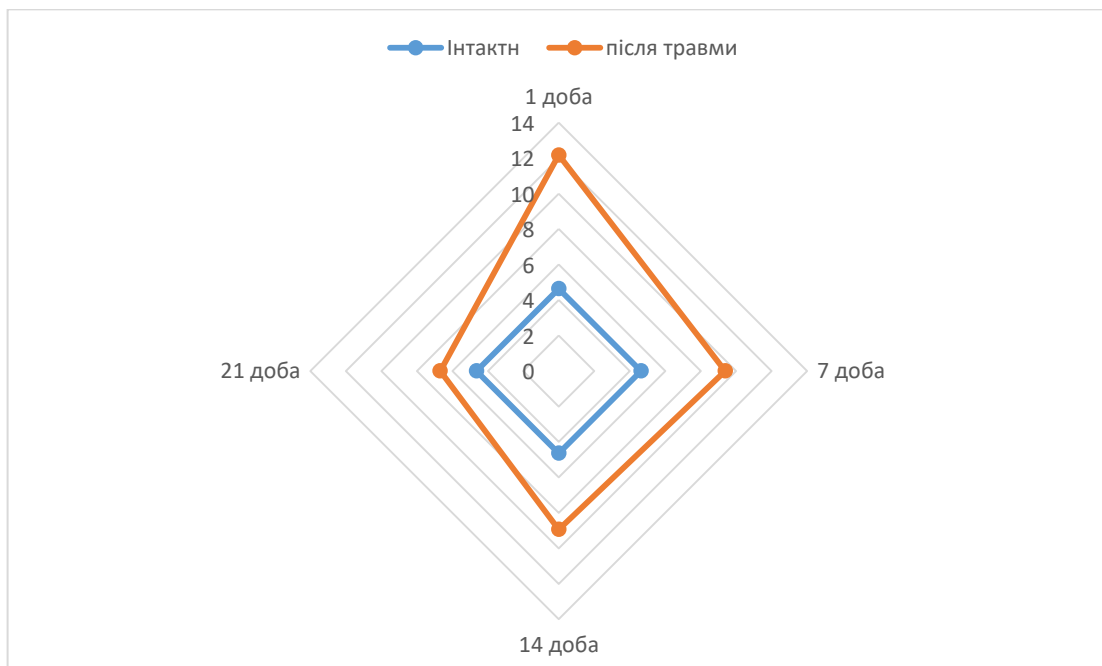


Рисунок 5.9 – Динаміка TNF- α після травматичного ушкодження м'язів

Аналізуючи динаміку зміни концентрації прозапальних цитокінів варто відмітити їх односпрямованість, зокрема, максимальне зростання на першу добу, незначне зниження та коливання практично на одному рівні протягом 7-ми – 14-ти діб та зниження до 21-ої доби (рис. 5.8, 5.9, 5.10).

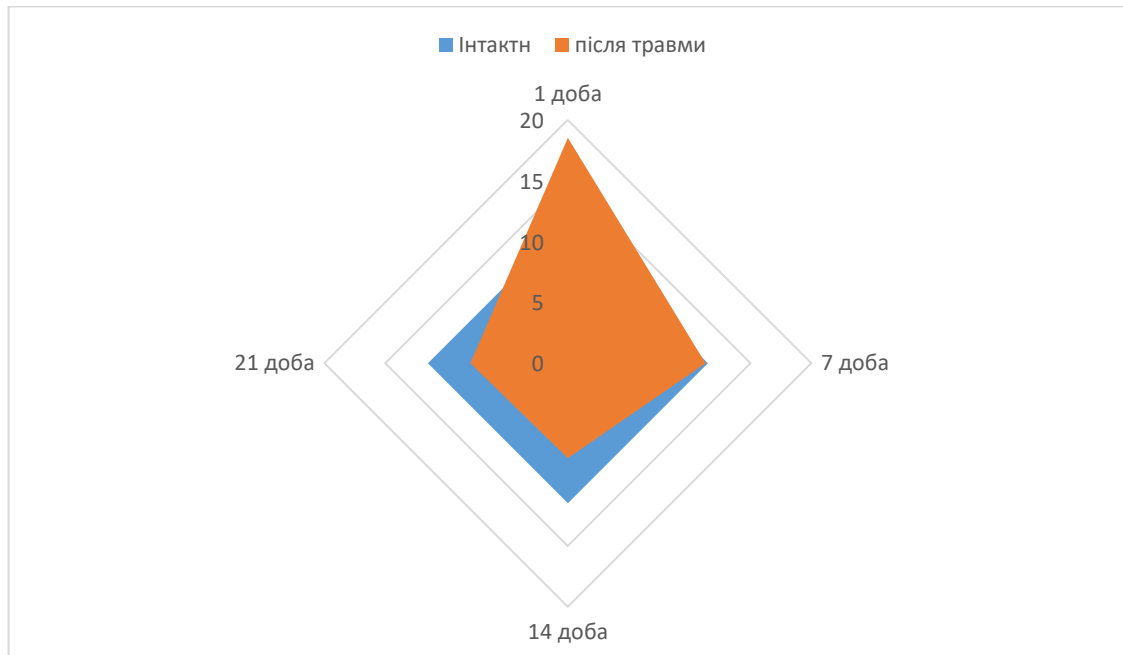


Рисунок 5.10 – Динаміка IL-10 після травматичного ушкодження м'язів

Концентрація протизапального IL-10 вірогідно зростала на 1-шу добу (в 1, 6 рази), тоді як на 7-му добу зменшувалась, статистично значимо не відрізняючись від показників інтактної групи. Варто зазначити, що на 14-ту добу концентрація даного цитокіну була менша в 1, 5 рази стосовно даних тварин без змодельованої патології і залишалася практично на тому ж рівні, що й у попередній термін спостереження, до 21-ої доби (табл. 5.10).

За даними Чорноморець П.М. та Нурищенко Н.Є., специфічною особливістю м'язового запалення є здатність самих м'язових волокон до секреції медіаторів запалення, зокрема, IL1- β , TNF- α та IL-6, які є хемотактичними агентами для нейтрофілів та інших імунокомпетентних клітин, внаслідок чого лейкоцити мігрують до пошкодженої ділянки м'яза та зумовлюють розвиток запалення. Патогенетично слід відмітити гіперпродукцію

активних форм оксигену нейтрофілами та активацію процесів вільнорадикального окиснення у локусі запалення, що є типовим патологічним процесом та ключовим пошкоджуючим чинником.

Застосування плазми крові, збагаченої тромбоцитами, супроводжувалось зменшенням концентрації прозапальних цитокінів сироватки крові. Збагачена тромбоцитами плазма містить фібрилярний і клітинний компоненти та здатна діяти як носій клітин, які важливі для регенерації м'яких і кісткових тканин. Так, концентрація IL1- β на 1-шу добу від моменту нанесення травми у тварин цієї групи перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 1,8 рази, однак був на 29,3 % меншим, ніж у тварин, яким моделювали травму, але корекції не проводили. Концентрація TNF- α також перевищував рівень здорових тварин у 2,1 рази, що, однак, на 21,0 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мала також концентрація IL6 – показник був 1,8 рази вищим, ніж в нормі, проте меншим від рівня тварин без змодельованої патології на 29,6 %. На цьому добу експерименту, не спостерігалось нормалізації прозапальних цитокінів. Зокрема, концентрація IL1- β була вищою від показника тварин без змодельованої патології в 1,5 рази та на 20,4 % меншим, ніж аналогічний показник тварин без корекції. Концентрація TNF- α та IL-6 за спрямованістю були майже аналогічним до показника IL1- β , перевищуючи норму відповідно в 1,7 та 1,6 рази, причому обидва показники були достовірно меншими, ніж у травмованих тварин, яким корекцію не проводили – на 21,8 та 19,0 % відповідно. Варто відмітити, що на 14-ту добу після PRP корекції концентрація прозапальних цитокінів практично не відрізнялася від даних попередньої групи спостереження (рис. 5.11).

Більш виразне зниження прозапальних цитокінів ми встановили на 21-шу добу експерименту. Так, у цей термін спостереження концентрації IL1- β , TNF- α та IL6 в 1,2 рази перевищувала рівень тварин без змодельованої патології. При цьому концентрація TNF- α та IL-6 були відповідно на 30,5 %, 21,9 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції (табл. 5.11, рис. 5.11, рис. 5.14).

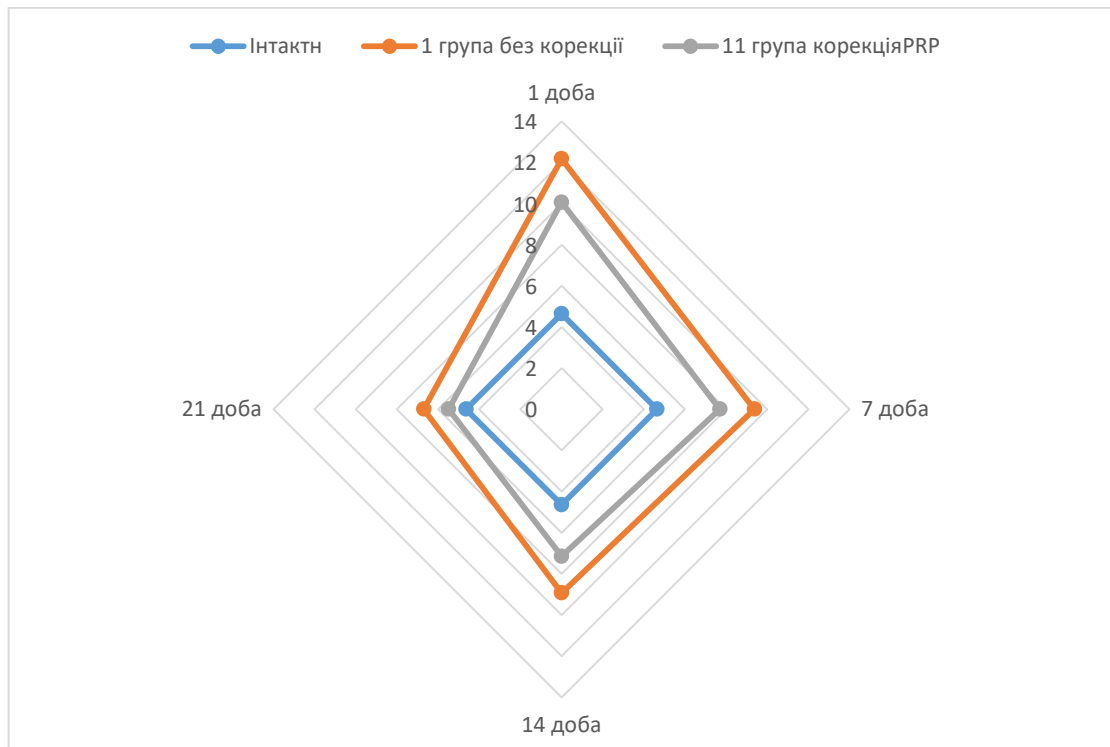


Рисунок 5.11 – Динаміка TNF- α після травматичного ушкодження м'язів та корекції PRP

Застосування плазми крові, збагаченої тромбоцитами, супроводжувалося вірогідним підвищенням концентрації IL-10 стосовно тварин без змодельованої патології та травмованих тварин, яким корекцію не проводили на першу добу експерименту (рис. 5.12).

На сьому добу досліджуваний показник знижувався в 1,5 рази відносно даних травмованих тварин, яким корекцію не проводили, проте був вірогідно вищий даних інтактної групи, тоді як у наступні терміни спостереження (14 і 21-ої доби) практично не відрізнявся від контролю (табл. 5.10, рис. 5.12).

Порівнюючи отримані дані до та після корекції можна зробити висновок щодо протизапального ефекту PRP, який характеризувався зниженням концентрації прозапальних цитокінів, які посилено продукуються при запальному процесі у відповідь на травму м'язів у всі терміни спостереження, та гіперпродукцією протизапального IL-10, який

може пригнічувати вироблення TNF- α та послаблювати його негативні ефекти (рис. 5.13).

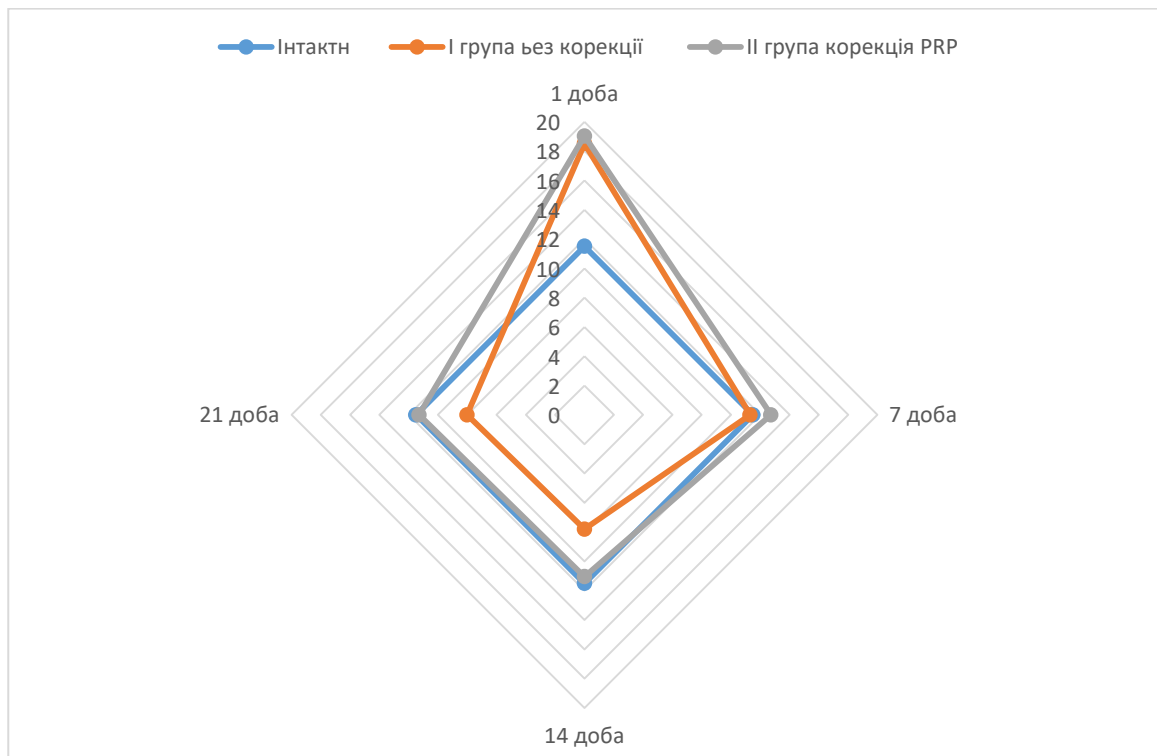


Рисунок 5.12 – Динаміка IL-10 після травматичного ушкодження м'язів та корекції PRP

За даними P. Vendinelli та співавт. (2010) протизапальний ефект PRP реалізується шляхом редукції експресії COX2 і CXCR4 генів, які беруть участь в реакціях запалення. При цьому, інші наукові дані засвідчують аналгетичні властивості PRP, їх здатність зменшувати набряки м'яких тканин при травмах різного генезу, вплив на ангиогенез та неоваскуляризацію.

У групі тварин, яким проводилась корекція травматичного ушкодження м'язів МСК, концентрація прозапальних цитокінів сироватки крові зменшувалась. Так, концентрація IL1- β на 1-шу добу від моменту нанесення травми у тварин цієї групи перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 1,9 рази, однак був на 18,7 % меншим, ніж у тварин, яким моделювали травму, але корекції не проводили.

Таблиця 5.10 Динаміка показників цитокинового профілю сироватки крові щурів з м'язовою травмою та корекцією ($M \pm m$)

Група тварин		Показник			
		IL-1 β , пг/мл	TNF- α , пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-10, пг/мл
Інтактні, n=12		5,20 \pm 0,16	4,64 \pm 0,23	4,40 \pm 0,14	11,50 \pm 0,29
Перша група	1-ша доба (n=9)	12,37 \pm 0,25*	12,17 \pm 0,27*	10,41 \pm 0,18*	18,52 \pm 0,29*
	7-ма доба (n=8)	9,43 \pm 0,21*	9,38 \pm 0,23*	8,39 \pm 0,18*	11,31 \pm 0,28
	14-та доба (n=8)	9,90 \pm 0,27*	8,93 \pm 0,18*	8,13 \pm 0,23*	7,80 \pm 0,29*
	21-ша доба (n=7)	8,43 \pm 0,26*	6,69 \pm 0,24*	5,74 \pm 0,19*	8,01 \pm 0,18*
Друга група	1-ша доба (n=9)	9,57 \pm 0,13* [#]	10,06 \pm 0,15* [#]	8,03 \pm 0,09* [#]	19,03 \pm 0,14* [#]
	7-ма доба (n=9)	7,83 \pm 0,12* [#]	7,70 \pm 0,20* [#]	7,05 \pm 0,16* [#]	12,73 \pm 0,33* [#]
	14-та доба (n=8)	7,34 \pm 0,17* [#]	7,15 \pm 0,12* [#]	6,84 \pm 0,11* [#]	11,04 \pm 0,17 [#]
	21-ша доба (n=8)	6,46 \pm 0,11* [#]	5,49 \pm 0,14* [#]	5,26 \pm 0,12* [#]	11,29 \pm 0,18
Третя група	1-ша доба (n=9)	10,06 \pm 0,11* [#]	10,81 \pm 0,12* [#]	8,28 \pm 0,06* [#]	19,41 \pm 0,18* [#]
	7-ма доба (n=9)	7,96 \pm 0,10* [#]	8,03 \pm 0,16* [#]	7,12 \pm 0,13* [#]	13,21 \pm 0,29* [#]
	14-та доба (n=8)	7,62 \pm 0,12* [#]	7,38 \pm 0,11* [#]	6,93 \pm 0,10* [#]	11,98 \pm 0,14 [#]
	21-ша доба (n=8)	6,59 \pm 0,09* [#]	5,68 \pm 0,11* [#]	5,51 \pm 0,07* [#]	11,42 \pm 0,13

Примітка. * – зміни показників достовірні відносно інтактних ($p < 0,05$); [#] – зміни показників тварин з корекцією достовірні відносно показників без корекції на відповідні доби дослідження ($p < 0,05$).

Концентрація TNF- α також перевищував рівень здорових тварин у 2,3 рази, що, однак, на 11,2 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мала також концентрація IL-6 – показник був 1,9 рази вищим, ніж у групі інтактних, проте меншим від рівня тварин без корекції на 20,4 %.

На сьому добу експерименту, не спостерігалось нормалізації прозапальних цитокінів. Зокрема, концентрація IL-1 β була вищою від показника тварин без змодельованої патології в 1,5 рази та на 15,6 % меншим, ніж аналогічний показник тварин без корекції. Концентрація TNF- α та IL-6 за спрямованістю були майже аналогічним до показника IL-1 β , перевищуючи норму відповідно в 1,7 та 1,6 рази, причому обидва показники були достовірно меншими, ніж у травмованих тварин, яким корекцію не проводили – на 14,4 та 15,01 % відповідно. Варто відмітити, що на 14-ту добу після корекції МСК концентрація IL-1 β була вищою від показника тварин без змодельованої патології в 1,5 рази та на 23,63 % меншим, ніж аналогічний показник тварин без корекції..

Більш виразне зниження прозапальних цитокінів ми встановили на 21-шу добу експерименту. Так, у цей термін спостереження концентрації IL-1 β в 1,3 рази, TNF- α – в 1,2 рази та IL-6-в 1,3 рази перевищували рівень тварин без змодельованої патології. При цьому концентрація TNF- α та IL-1 β були відповідно на 15,1 %, 21,8 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції (табл. 5.10). IL6 має як прозапальну так і протизапальну дію в залежності від фази запального процесу. На початкових етапах він може відповідати за запуск запалення та розвиток вторинного пошкодження тканини, на завершальних етапах – брати участь у регуляції процесів регенерації (табл. 5.10, рис. 5.13).

Застосування МСК, супроводжувалось достовірним підвищенням концентрації IL-10 в 1.7 рази стосовно інтактних тварин. На сьому добу досліджуваній показник знижувався в 31,9 % відносно даних першої доби, проте був вищий в 1, 1 рази даних інтактною групи, тоді як у наступні терміни спостереження на 14-ту добу IL10 знижувався в 9,5 % відносно даних сьомої

доби, та наближався до даних інтактної групи а на 21-шу добу практично не відрізнявся від контролю (табл. 5.10).

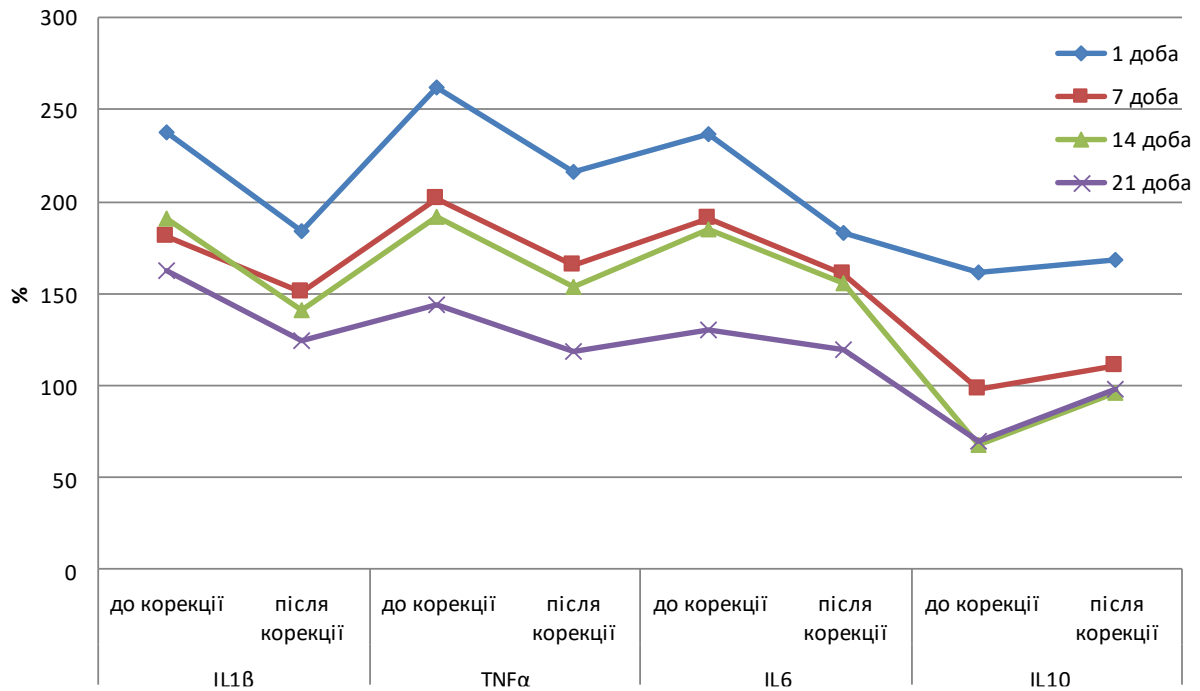


Рисунок 5.13 – Співставлення показників цитокінового профілю сироватки крові щурів з м'язовою травмою та корекцією PRP

Отже, у тварин з механічною травмою м'язів стегна спостерігається підвищення концентрації IL1-β, TNF-α та IL-6 сироватки крові на тлі виснаження протизапальних резервів (рис. 5.13). Показники прозапальних цитокінів сироватки крові у щурів, яким моделювали травму м'язів, були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології. Застосування плазми крові, збагаченої тромбоцитами та МСК супроводжувалось зменшенням концентрації прозапальних цитокінів сироватки крові починаючи з першої доби експерименту. Порівнюючи отримані дані до та після корекції можна зробити висновок щодо протизапального ефекту PRP, МСК який характеризувався зниженням концентрації прозапальних цитокінів, які посилено продукуються при запальному процесі у відповідь на травму м'язів у всі терміни спостереження, та гіперпродукцією протизапального IL-10, який може пригнічувати вироблення TNF-α та послаблювати його негативні ефекти.

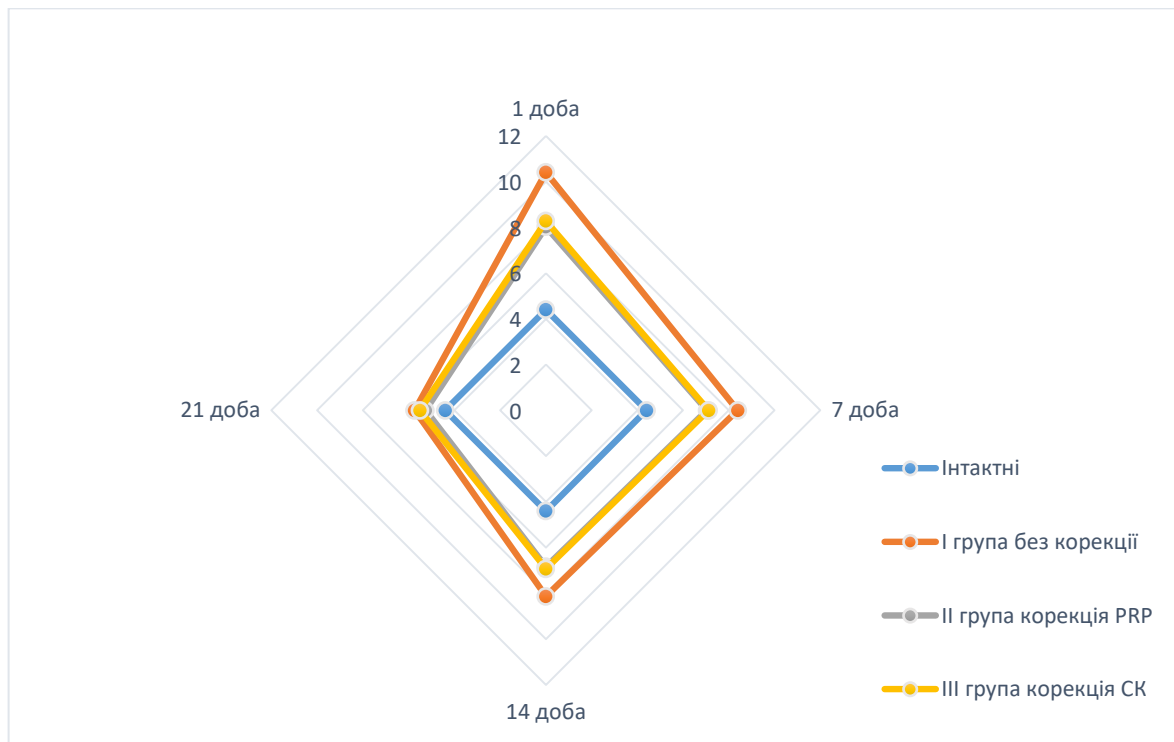


Рисунок 5.14 – Динаміка ІЛ-6 після травматичного ушкодження м'язів та корекції

Оскільки цитокіни діють не тільки локально, тому місцеве запалення супроводжується системною реакцією. При цьому, за умови значного пошкодження м'язів порушення балансу між про– та протизапальною реакцією може спричинити генералізовану відповідь, яка, у свою чергу, може зумовити поліорганну недостатність.

В механізмах індукції загоєння м'язової тканини збагаченою тромбоцитами плазмою крові основну функцію виконують фактори росту, яких на даний час відомо понад: тромбоцитарний фактор росту, трансформуючий фактор росту – 1, тромбоцитарний фактор ангіогенезу, інсуліноподібний фактор росту, остеокальцин, остеонектин, фібриноген та інші. Їх дія проявляється локально за рахунок залучення недиференційованих клітин до нового сформованого матриксу і запуску клітинного ділення в ділянці ушкодження.

5.4 Зміни стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ при травматичному ушкодженні м'язів та після проведення корекції

Аналізуючи показники протеолітичної активності сироватки крові у щурів, яким моделювали травму м'язів, встановили, вони були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології. Так, лізис азоальбуміну на першу добу після нанесення травми був достовірно вищим від показника тварин без змодельованої патології у 7,6 рази. Аналогічні зміни були відмічені і стосовно лізису азоказеїну та азоколу. Зокрема, показник лізису азоказеїну у цей термін спостереження був у 10,3, а лізис азоколу – у 7,7 разів вищим, ніж у тварин, яким травми не моделювали. В обох випадках різниця між показниками була достовірною. На сьому добу показник лізису азоальбуміну дещо знизився, однак перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 4,6 рази. Зміни показників лізису азоказеїну та азоколу мали аналогічну спрямованість і на 7-му добу від моменту нанесення травми склали відповідно 843,5 та 514,8 % від показників тварин без змодельованої патології. До 14-ої доби показник лізису азоальбуміну залишався практично на тому ж рівні, що й у попередній термін спостереження, а показники азоказеїну та азоколу знижувались, однак все ж перевищували рівень тварин без змодельованої патології відповідно у 6,1 та 2,6 рази відповідно. До 21-ої доби усі показники, що характеризують стан протеолітичної активності сироватки крові зменшувались, проте були достовірно вищими від норми. Так, лізис азоальбуміну склав 330,7 %, азоказеїну – 329,1 %, азоколу – 265,4 % від аналогічних показників здорових тварин (табл. 5.11, рис. 5.15).

Застосування плазми крові, збагаченою тромбоцитами, супроводжувалось зменшенням протеолітичної активності сироватки крові. Лізис азоальбуміну на 1-шу добу від моменту нанесення травми у тварин цієї групи перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 5,8 рази, однак був на 30,5 % меншим, ніж у тварин, яким моделювали травму, але корекції не проводили. Лізис азоказеїну також перевищував

рівень здорових тварин у 8,9 рази, що, однак, на 16 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мав також лізис азоколу – показник був 5,3 рази вищим, ніж в нормі, проте меншим від рівня тварин без змодельованої патології на 44,4 %.

Таблиця 5.11 Динаміка показників протеолітичної активності сироватки крові щурів з м'язовою травмою ($M \pm m$)

Показник/ Група тварин		Лізис азоальбуміну, $\text{мл}^{-1} \times \text{год}^{-1}$	Лізис азоказеїну, $\text{мл}^{-1} \times \text{год}^{-1}$	Лізис азоколу, $\text{мл}^{-1} \times \text{год}^{-1}$
Інтактні, n=12		$2,47 \pm 0,05$	$2,16 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,02$
Перша група	1-ша доба (n=9)	$18,74 \pm 0,21^*$	$22,34 \pm 0,17^*$	$6,24 \pm 0,04^*$
	7-ма доба (n=8)	$11,24 \pm 0,18^*$	$18,22 \pm 0,15$	$4,17 \pm 0,05^*$
	14-та доба (n=8)	$12,16 \pm 0,11^*$	$13,23 \pm 0,12$	$2,11 \pm 0,03^*$
	21-ша доба (n=7)	$8,17 \pm 0,10^*$	$7,11 \pm 0,14^*$	$1,79 \pm 0,04^*$
Примітка. * – $p < 0,05$ – вірогідні відмінності порівняно з тваринами контрольної групи.				

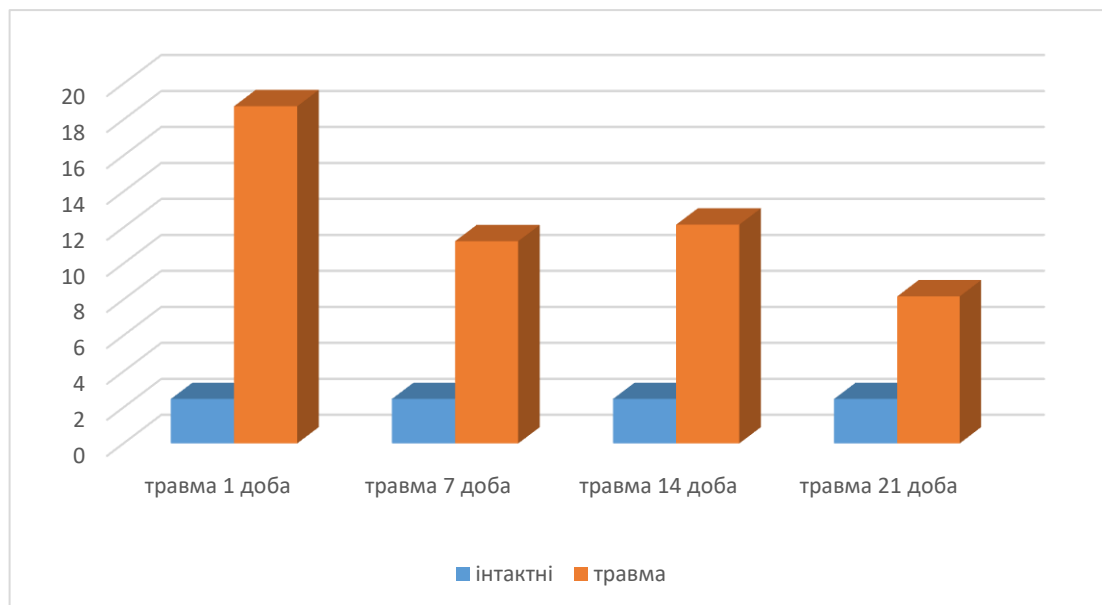


Рисунок 5.15 – Динаміка показника лізису азоальбуміну сироватки крові щурів в посттравматичному періоді

На 7-му добу експерименту, не спостерігалось нормалізації протеолітичної активності. Зокрема, лізис азоальбуміну був вищим від показника тварин без змодельованої патології в 3,9 рази та на 17,8 % меншим, ніж аналогічний показник тварин без корекції. Показники лізису азоказеїну та азоколу за спрямованістю були майже аналогічним до показника азоальбуміну, однак в цифровому вимірі відрізнялися. Зокрема, показник азоказеїну перевищував норму у 7,1 рази, а азоколу – у 2,7 рази, причому обидва показники були достовірно меншими, ніж у травмованих тварин, яким корекцію не проводили – на 18,8 та 93,9 % відповідно.

Більш виразне зниження протеолітичної активності ми встановили на 14-ту добу експерименту. Лізис азоальбуміну у цей термін спостереження перевищував рівень тварин без змодельованої патології у 4 рази і був на 24,7 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції. Лізис азоказеїну був дещо вищим – перевищення стосовно здорових тварин склало 4,2 рази, що на 44,1 % менше, ніж у тварин без корекції. Лізис азоколу був ще меншим – 192 % від показника тварин без змодельованої патології і на 35,2 % менше, ніж у травмованих тварин, яким корекція не проводилась. До 21-ої доби активність протеолітичних процесів суттєво знизилась. Показник лізису азоальбуміну перевищував аналогічний показник інтактних тварин в 1,7 рази, що на 93,6 % менше, ніж у тварин без корекції. Лізис азоказеїну перевищував норму в 1,7 рази, азоколу – в 1,5 рази. Ці показники були меншими від аналогічних показників тварин без корекції (табл. 5.15).

Аналізуючи результати корекції травматичного ушкодження м'язів збагаченою тромбоцитами плазмою крові встановили вплив на сповільнення активності процесів протеолізу, що може мати суттєве значення для пришвидшення процесів регенерації м'язової тканини, ушкодженої внаслідок механічної травми.

В третій групі, де корекція проводилась мезенхімальними стовбуровими клітинами показник лізису азоальбуміну на 1-шу добу від моменту нанесення травми перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 6,7 рази, однак

був на 11,3 % меншим, ніж у тварин першої піддослідної групи. Лізис азоказеїну також перевищував рівень здорових тварин у 9,3 рази, що на 9,1 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мав також показник лізису азоколу – показник був 5,5 рази вищим ніж у тварин без змодельованої патології, проте меншим від рівня тварин без корекції на 27,4 %. (табл. 5.12).

Таблиця 5.12 – Динаміка показників протеолітичної активності сироватки крові щурів з м'язовою травмою та корекцією ($M \pm m$)

Група тварин		Показник		
		Лізис азоальбуміну, $мл^{-1} \times год^{-1}$	Лізис азоказеїну, $мл^{-1} \times год^{-1}$	Лізис азоколу, $мл^{-1} \times год^{-1}$
Інтактні, n=12		2,47 ± 0,05	2,16 ± 0,04	0,81 ± 0,02
Перша група	1-ша доба (n=9)	18,74 ± 0,21 [*]	22,34 ± 0,17 [*]	6,24 ± 0,04 [*]
	7-ма доба. (n=8)	11,24 ± 0,18 [*]	18,22 ± 0,15	4,17 ± 0,05 [*]
	14-та доба. (n=8)	12,16 ± 0,11 [*]	13,23 ± 0,12	2,11 ± 0,03 [*]
	21-ша доба (n=7)	8,17 ± 0,10 [*]	7,11 ± 0,14 [*]	1,79 ± 0,04 [*]
Друга група	1-ша доба (n=9)	14,36 ± 0,11 ^{*#}	19,26 ± 0,15 ^{*#}	4,32 ± 0,06 ^{*#}
	7-ма доба (n=9)	9,54 ± 0,08 ^{*#}	15,33 ± 0,11 ^{*#}	2,15 ± 0,04
	14-та доба (n=8)	9,75 ± 0,09 ^{*#}	9,18 ± 0,09 ^{*#}	1,56 ± 0,05 ^{*#}
	21-ша доба (n=8)	4,22 ± 1,06 ^{*#}	3,75 ± 0,07 ^{*#}	1,21 ± 0,03 ^{*#}
Третя група	1-ша доба (n=9)	16,62 ± 0,12 ^{*#}	20,29 ± 0,12 ^{*#}	4,53 ± 0,04 ^{*#}
	7-ма доба (n=9)	10,18 ± 0,04 ^{*#}	15,98 ± 0,09 ^{*#}	2,29 ± 0,03
	14-та доба (n=8)	9,87 ± 0,07 ^{*#}	9,34 ± 0,06 ^{*#}	1,72 ± 0,04 ^{*#}
	21-ша доба (n=8)	4,96 ± 1,01 ^{*#}	3,75 ± 0,07 ^{*#}	1,25 ± 0,02 ^{*#}
Примітка. * – зміни показників достовірні відносно інтактних ($p < 0,05$); # – зміни показників тварин з корекцією достовірні відносно показників без корекції на відповідні доби дослідження ($p < 0,05$).				

На 7-му добу лізис альбуміну третьої піддослідної групи перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 4,1 рази, однак був на 9,4 %

меншим, ніж у тварин, яким моделювали травму, але корекції не проводили. Лізис азоказеїну також перевищував рівень здорових тварин у 7,3 рази, що, однак, на 12,2 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мав також лізис азоколу – показник був 2,8 рази вищим ніж у тварин без змодельованої патології, проте меншим від рівня тварин без корекції на 45 % (табл. 5.12)

Лізису азоальбуміну на 14-ту добу спостереження перевищував рівень тварин без змодельованої патології у 3,9 рази і був на 18,8 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції. Лізис азоказеїну був дещо вищим – перевищення стосовно здорових тварин склало 4,3 рази, що на 29,4 % менше, ніж у тварин без корекції. Лізис азоколу у цей термін спостереження перевищував рівень тварин без змодельованої патології у 5,5 рази і був на 18,4 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції. На 21-шу добу показник лізису азоальбуміну перевищував аналогічний показник інтактних тварин в 2 рази, що на 39,2 % менше, ніж у тварин без корекції. Лізис азоказеїну перевищував норму в 1,7 рази, азоколу – в 1,5 рази. Ці показники були меншими від аналогічних показників тварин без корекції відповідно на 47,2 та 30,1 % (табл. 5.12)

Вміст білкових інгібіторів плазми крові також зазнавав виражених змін (табл. 5.13). На першу добу спостереження встановлено достовірне підвищення інгібіторного потенціалу крові тварин, яким моделювали травматичне ушкодження м'язів. Зокрема, концентрація α_1 -ІІІ, збільшилася в 2,1 рази. Щодо, α_2 -МГ то його концентрація теж зросла, однак дещо менше – в 1,8 рази порівняно з тваринами без змодельованої патології. Виразне збільшення вмісту α_1 -ІІІ може бути зумовлене його підвищеною продукцією паралельно з гіперпродукцією інших гострофазових білків у відповідь дію травматичного чинника. Крім того, підвищення активності основних білкових інгібіторів можна розцінювати як неспецифічну захисну реакцію організму на посилений протеоліз та запуск фізіологічних процесів адаптації у відповідь на підвищення протеолітичної активності крові.

Таблиця 5.13 – Динаміка показників інгібіторів протеаз сироватки крові та катепсину D м'язової тканини щурів м'язовою травмою і корекцією (M ± m)

Група тварин		Показник			
		α_1 -ІІІ, мкмоль/л	α_2 -МГ, г/л	Індекс протеолізу	Катепсин D, нмоль тирозину/(мг б-ка × хв)
Інтактні, n=12		41,33 ± 2,28	2,38 ± 0,05	0,124 ± 0,006	3,87 ± 0,08
Перша група	1-ша доба (n=9)	86,75 ± 1,21 [*]	4,32 ± 0,11 [*]	0,521 ± 0,011	14,43 ± 0,16 [*]
	7-ма доба (n=8)	51,32 ± 1,16	3,96 ± 0,09	0,608 ± 0,014	8,31 ± 0,14
	14-та доба (n=8)	46,42 ± 1,07 [*]	3,18 ± 0,07 [*]	0,557 ± 0,012	6,75 ± 0,10
	21-ша доба (n=7)	39,27 ± 1,13 [*]	2,37 ± 0,08 [*]	0,324 ± 0,009 [*]	4,82 ± 0,12 [*]
Друга група	1-ша доба (n=9)	66,25 ± 1,41 ^{*#}	3,83 ± 0,07 ^{*#}	0,541 ± 0,011 ^{*#}	9,76 ± 0,14 ^{*#}
	7-ма доба (n=9)	55,24 ± 1,56 ^{*#}	3,38 ± 0,05 ^{*#}	0,461 ± 0,014 ^{*#}	7,37 ± 0,11 ^{*#}
	14-та доба (n=8)	52,73 ± 1,23 ^{*#}	3,35 ± 0,06 ^{*#}	0,365 ± 0,012 ^{*#}	4,55 ± 0,09 ^{*#}
	21-ша доба (n=8)	40,23 ± 1,07 ^{*#}	2,84 ± 0,07 ^{*#}	0,213 ± 0,011 ^{*#}	4,43 ± 0,07 ^{*#}
Третя група	1-ша доба (n=9)	68,31 ± 1,12 ^{*#}	3,96 ± 0,08 ^{*#}	0,556 ± 0,2 ^{*#}	9,89 ± 0,15 ^{*#}
	7-ма доба (n=9)	57,29 ± 1,34 ^{*#}	3,45 ± 0,06 ^{*#}	0,469 ± 0,012 ^{*#}	7,98 ± 0,10 ^{*#}
	14-та доба (n=8)	53,54 ± 1,16 ^{*#}	3,40 ± 0,07 ^{*#}	0,372 ± 0,013 ^{*#}	4,98 ± 0,06 ^{*#}
	21-ша доба (n=8)	41,27 ± 1,03 ^{*#}	2,92 ± 0,05 ^{*#}	0,221 ± 0,009 ^{*#}	4,49 ± 0,06 ^{*#}

Примітка. * – зміни показників достовірні відносно інтактних (p<0,05); # – зміни показників тварин з корекцією достовірні відносно показників без корекції на відповідні доби дослідження (p<0,05).

Менш виразне зростання інгібіторного потенціалу, поряд із суттєвим зростанням протеолітичної активності, відобразилося на значенні індексу протеолізу – він зріс у 4,2 рази. На сьому добу концентрація α_1 -ІІІ перевищувала рівень тварин без патології на 24,2 %, а α_2 -МГ – на 66,4 %. Однак, зважаючи зростання у цей період протеолітичної активності крові, індекс протеолізу зріс і був вищим у 4,9 рази від показника інтактних тварин.

На 14-ту добу від моменту нанесення механічної травми м'язів вміст білкових інгібітор у сироватці крові суттєво зменшився. Концентрація α_1 -ІІІ становила 112,3 % відносно тварин без патології, а α_2 -МГ – 133,6 %, що вказує на виснаження антипротеазних резервів крові. Це є одним з чинників, що не дозволяють нормалізувати активність процесів протеолізу на тлі високої активності протеолітичних ензимів, на що вказує достовірне зростання ІІІ у 4,5 рази. До 21-ої доби показники інгібіторів протеаз і надалі знижувались – концентрація α_1 -ІІІ була меншою, ніж в інтактних тварин (95,0 %), а α_2 -МГ перебувала на рівні тварин без травми. Однак нормалізація концентрації антипротеаз не корелювала з активність протеолітичних ензимів, тому індекс протеолізу все ж був достовірно вищим, ніж у нормі і склав 261,3 %.

Застосування коригуючого чинника збагаченої тромбоцитами плазми крові супроводжувалось суттєвим зсувом співвідношення протеази/інгібітори протеаз у бік переважання процесів інгібування протеолізу. Вже на першу добу спостереження вміст обох ключових інгібіторів протеолізу достовірно знижувався як стосовно тварин без змодельованої патології, так тварин, яким корекцію не проводили. Зокрема, концентрація α_1 -ІІІ склала 160,3 %, а α_2 -МГ – 160,9 % від рівня інтактних тварин, достовірно відрізняючись від аналогічних показників тварин з травмою без корекції в 1,3 та 1,2 рази відповідно. Однак, на тлі зростання протеолітичних процесів у цей термін спостереження спостерігалось навіть більш виразне зростання ІІІ – в 4,3 рази порівняно з інтактними тваринами і на 4 % – порівняно з тваринами без корекції. На 7-му добу, ми відмітили подальше зниження інгібіторної активності сироватки крові порівняно з попереднім терміном. Концентрація α_1 -ІІІ склала 133,6 %, а α_2 -МГ – 142,1 % від рівня тварин без змодельованої патології, водночас відрізняючись від аналогічних показників тварин без корекції. Однак індекс протеолізу був значно меншим, ніж у групі тварин без корекції – на 31,9 %, хоча в 3,7 рази перевищував рівень інтактних. На 14-ту добу інгібіторний потенціал крові знижувався повільніше, ніж фактори протеолізу, що спричинилося до більш

суттєвого зниження інгібіторного потенціалу крові, порівняно з тваринами без застосування коригуючого чинника. Індекс хоча і перевищував аналогічний показник інтактних тварин у 2,9 рази, проте був меншим від показника тварин без корекції в 1,5 рази. Концентрація α_1 -ІІІ при цьому склала 127,6 %, а α_2 -МГ – 140,7 % від рівня інтактних тварин. На 21-шу добу експерименту концентрація α_1 -ІІІ досягнула рівня інтактних тварин, а α_2 -МГ перевищувала її на 22,6 %. При цьому індекс протеолізу також суттєво знизився і склав 171,8 % відносно інтактних тварин, що на 52,1 % менше, ніж у групі, якій корекцію не проводили (табл. 5.13, рис. 5.16).

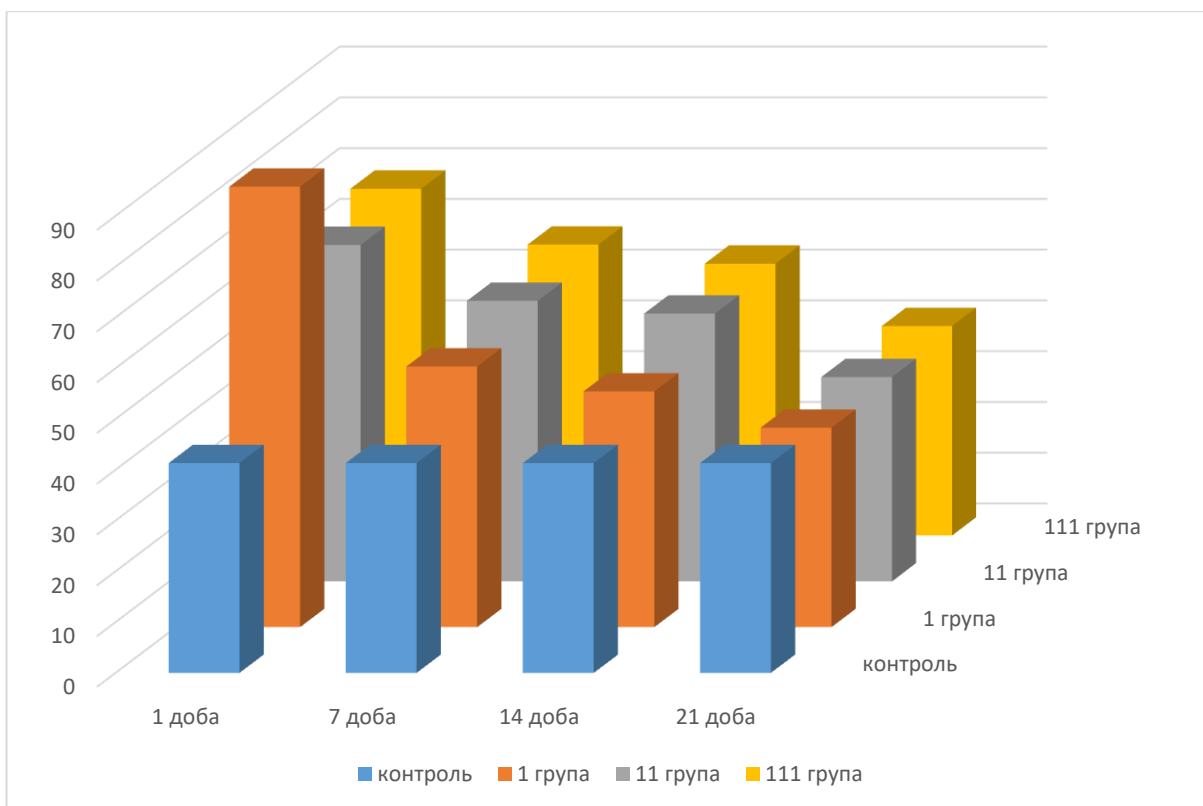


Рисунок 5.16 – Динаміка показника α_1 -ІІІ, мкмоль/л м'язової тканини щурів з м'язовою травмою і корекцією

Застосування мезенхімальних стовбурових клітин супроводжувалось зміною співвідношення протеази/інгібітори протеаз з переважанням процесів інгібування протеолізу. Вже на першу добу спостереження вміст обох ключових інгібіторів протеолізу достовірно знижувався як стосовно тварин без змодельованої патології, так тварин, яким корекцію не проводили. Зокрема,

концентрація α_1 -ІІІ склала 165,2 %, а α_2 -МГ – 166,3 % від рівня інтактних тварин, достовірно відрізняючись від аналогічних показників тварин з травмою без корекції в 78,7 % та 91 % відповідно.

На 7-му добу, ми відмітили подальше зниження інгібіторної активності сироватки крові порівняно з попереднім терміном. Концентрація α_1 -ІІІ склала 138,6 %, а α_2 -МГ – 144,9 % від рівня тварин без змодельованої патології, водночас відрізняючись від аналогічних показників тварин без корекції. Однак індекс протеолізу був значно меншим, ніж у групі тварин без корекції – на 22,8 %, хоча в 3,7 рази перевищував рівень інтактних. На 14-ту добу інгібіторний потенціал крові знижувався повільніше, ніж фактори протеолізу, що спричинилося до більш суттєвого зниження інгібіторного потенціалу крові, порівняно з тваринами без застосування коригуючого чинника. Індекс хоча і перевищував аналогічний показник інтактних тварин Концентрація α_1 -ІІІ при цьому склала 129,5 %, а α_2 -МГ – 142,8 % від рівня інтактних тварин. На 21-шу добу експерименту концентрація α_1 -ІІІ досягнула рівня інтактних тварин, а α_2 -МГ перевищувала її на 18,5 %. При цьому індекс протеолізу також суттєво знизився і склав 178,2 % відносно інтактних тварин, що на 31,6 % менше, ніж у групі, якій корекцію не проводили (табл. 5.13).

Дослідження загальної активності маркерного ферменту лізосомального матриксу катепсину D показало, що моделювання механічної травми м'язів призвело до достовірного зростання загальної активності катепсину D на першу добу експерименту у 3,7 рази з подальшим її зниженням у подальші терміни спостереження відносно тварин без змодельованої патології, що вказує на стабілізацію лізосомальних мембрану динаміці патологічного процесу. До 21-ої доби показник перевищував рівень інтактних тварин на 24,5 %. У тварин, яким на тлі змодельованої травми проводили корекцію спостерігали більш помірне зростання активності катепсину D на усіх етапах розвитку патологічного процесу, порівняно з групою тварин, яким корекцію не проводили. Зокрема, на першу добу від моменту моделювання травми і уведення плазми, збагаченої тромбоцитами, ензимна активність зросла у 2,5 рази, що достовірно менше, ніж

у групі без корекції. Уже до 14-ої доби показник відрізнявся від норми лише на 14,9 % і також був достовірно меншим, ніж у групі без корекції. На 21-шу добу активність катепсину D достовірно не відрізнялась від аналогічного показника інтактних тварин і тварин без корекції (табл. 5.13).

Зокрема, на першу добу від моменту моделювання травми і введення МСК, ензимна активність становила $9,89 \pm 0,15$, що достовірно менше, ніж у групі без корекції. Уже до 14-ої доби показник відрізнявся від норми лише на 22,3 % і також був достовірно меншим, ніж у групі без корекції. На 21-шу добу активність катепсину D достовірно не відрізнялась від аналогічного показника інтактних тварин і тварин без корекції (табл. 5.13).

На основі наведених у розділі 5 результатів можна зробити такі проміжні висновки:

1. При травматичному ушкодженні м'язів стегна відбувається гіперактивація вільнорадикального окислення ліпідів починаючи з першої доби та досягаючи максимуму до 14-ої доби посттравматичного періоду порівняно з контрольною групою.

2. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та МСК призводить до зменшення активності перекисного окислення ліпідів, що зумовлює зменшення ознак запалення в травмованому м'язі.

3. У тварин з механічною травмою м'язів стегна спостерігається інтенсивне зростання протеолітичної активності крові на тлі менш виразного зростання антипротеазної активності, а також зростання проникності лізосомальних мембран. Це призводить до значного дисбалансу у системі протеази/антипротеази і зростання індексу протеолізу. Застосування плазми, збагаченої тромбоцитами та стовбурових клітин зменшує цей дисбаланс, що супроводжується зниженням індексу протеолізу особливо у більш пізні терміни після нанесення травми.

Наведені в розділі результати опубліковано у наукових працях автора [29, 30, 32, 34, 36, 140, 141].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Скелетні м'язи є найпоширенішою тканиною в організмі людини, яка становить близько 40 % маси тіла. У повсякденному житті відбувається часте пошкодження м'язів, зокрема, механічні травми, термічний стрес, ішемія, дія різних патогенних чинників. Травми м'язів – одна з найпоширеніших травм, що виникають у спорті. Незважаючи на їх клінічне значення, існує лише кілька клінічних досліджень щодо лікування м'язових травм. Відсутність клінічних досліджень, швидше за все, пояснюється тим, що спостерігається не тільки висока неоднорідність тяжкості травм, але й травми мають місце в різних м'язах, що робить дуже вимогливим проведення клінічних випробувань.

Вирішальне значення для регенерації м'язів після травми мають м'язові супутникові клітини. Після травми стовбурові клітини м'язів активізуються, диференціюються та з'єднуються для відновлення пошкодженої ділянки. Легка травма індукує розрив волокна та набір навколишніх супутникових клітин на неушкодженій частині волокна. Навпаки, сильна травма запускає повне руйнування міофібри з подальшим розмноженням та диференціацією супутникових клітин на залишках позаклітинного матриксу, які називаються «волокнами привидів» [156].

Процес регенерації передбачає участь різних типів клітин, які модулюють їх поведінку відповідно до секреторних та біомеханічних даних. Незважаючи на те, що трансплантація стовбурових клітин м'язів після травми показала успішну часткову регенерацію, проте в них низька виживаність і самовідновлення та нездатність до дифузії в тканини. При поєднанні стовбурових клітин, факторів росту та матриксів з біоінженерії регенеративна здатність пересаджених МСК підвищується, що створює перспективи для подальших досліджень [104, 136].

Хоча супутникові клітини – це стовбурові клітини м'язів – сприяють функціональному відновленню м'язів після пошкодження, деякі інші клітини,

такі як клітини запалення, судин та мезенхіми, координують регенерацію м'язів у тонко налаштованому процесі.

В останні роки для стимуляції процесів репарації різних пошкоджень чи травм лікарі все частіше звертаються до перспективних засобів регенеративної медицини, що ґрунтуються на використанні аутологічних клітин чи формених елементів крові. Як абсолютно безпечний засіб такого типу розглядають збагачену тромбоцитами плазму (platelet rich plasma, PRP), що отримується з власної крові пацієнта, тому не викликає відторгнення чи алергії і не може нічим додатково інфікувати [15, 88, 90, 97, 111, 231, 240, 287]. Тромбоцити або кров'яні пластинки виконують виняткову роль у гемостазі, процесах запалення, клітинної проліферації та диференціації. У гранулах тромбоцитів знаходяться щонайменше 60 біологічно активних речовин, які стимулюють хемотаксис клітин, клітинну проліферацію і диференціювання, ангиогенез, імуномодуляцію та ремодуляцію. Серед цих активних субстанцій для репаративної тканинної регенерації найбільш важливими є ростові фактори – клітинні мітогени: фактори росту фібробластів, трансформуючі фактори росту, кісткові морфогенетичні білки, інсуліноподібні фактори росту, васкуло-ендотеліальний, епідермальний фактори росту тощо. Їх дія проявляється локально за рахунок залучення недиференційованих клітин до нового сформованого матриксу і запуску клітинного ділення в ділянці ушкодження. Однак ці механізми потребують уточнення та додаткового вивчення.

Використання PRP в клінічних умовах вимагає контрольованих клінічних випробувань, з послідовною методикою щодо дозування та препарату. Однак, цьому має передувати ретельне вивчення ефектів PRP *in vitro* та *in vivo*, щоб повністю зрозуміти механізми його дії та відповідні клінічні цілі.

Таким чином, використання збагаченої тромбоцитами плазми в експериментальних та клінічних дослідженнях в контексті загоєння ран та регенерації тканин є актуальною в останнє десятиліття. Однак, незважаючи на різноманітні програми, ефективність регенеративних методів лікування PRP залишається актуальною.

Першим етапом нашого дослідження було порівняльне вивчення впливу PRP на проліферативну активність фібробластів шкіри, МСК з м'язів плода та МСК із пуповини щурів в умовах *in vitro*.

Суспензію клітин, отриману із пуповинного канатика, шматочків шкіри, м'язів плода ферментативним методом, розділяли на дві порції: контрольну (із додаванням ЕСТ) та експериментальні (суспензія МСК клітин без факторів росту та клітинна суспензія + збагачена тромбоцитами плазма). Мікроскопічний аналіз досліду показав, що на 1-шу добу експерименту МСК пуповинного канатика у варіанті середовища без факторів росту показували слабкий конфлюент 5 %, тоді як варіант контролю – 40 %, а PRP – 30 %, щільність клітинної популяції фібробластів шкіри у варіанті контролю – 40 %, а варіант PRP – 45 %, МСК м'язової тканини у варіанті контролю – 50 %, PRP – 45 %, а в середовищі без факторів росту – 50 %. На 7-му добу культивування моношар (100 % конфлюент) утворився у варіанті контролю (лінії МСК із пуповинного канатика та МСК м'язової тканини) а також у варіанті PRP (фібробласти шкіри). На основі проведеного аналізу встановлено, що збагачена тромбоцитами плазма крові у вигляді 5 % добавки до ростового середовища має виражену стимулюючу дію на проліферативну активність фібробластів.

Фактори росту містяться в α -гранулах і вивільняються з них після активації тромбоцитів. Увесь спектр впливу тромбоцитів здійснюється через вивільнення різних типів протеїнів та активних речовин із α -гранул тромбоцитів. Сьогодні науці відомо більше 30 активних сполук, що вивільняються тромбоцитами під час активації, серед них: адгезивні білки (фібриноген, фактор Віллебранда, тромбоспондин), плазмові білки (IgG, альбумін), інгібітори протеаз (α 2-макроглобулін, α 2-антиплазмін), а також багато факторів росту

Mishra A. та співавтори [234] застосували експериментальну модель, в якій вивчили вплив 10 % PRP на проліферацію мезенхімальних клітин. Було виявлено значне посилення проліферації клітин у досліджуваній групі після

сім днів експозиції, збільшення рівня тРНК остеогенного маркера RUNX2, а також хондрогенних маркерів SOX-9 та протеогліканів.

Murphy M.B. та співавтори [212] довели, що пуповинна пуповинна PRP спричиняє значно вищу та швидшу проліферацію мезенхімальних клітин протягом семи днів експозиції.

Kruger J.P. та співавтори [218] дослідили вплив 5 % PRP на культуру клітин-попередників, отриманих з субхондральної кортико-спонгіозної кістки. Було показано значне посилення міграції клітин, а також синтезу клітинного матриксу, протеогліканів і колагену II типу. В подальшому автори [219] довели виражений стимулюючий вплив 5 % PRP на проліферацію клітин-попередників, синтез протеогліканів і колагену II типу полігліколевій – гіалуронової матриці.

Mifune Y. та співавтори [269] у своєму *in vitro* дослідженні показали, що додавання PRP стимулює проліферацію, адгезію та міграцію мезенхімальних клітин, отриманих із м'язів. Також PRP збільшує кількість колагену II типу та пригнічує апоптоз клітин.

Xie X. та співавтори [298] продемонстрували, що кістково-мозкові мезенхімальні клітини кролика мають значно кращу проліферативну активність та вищу експресію специфічних хрящових генів і білків у присутності PRP-матриці, аніж мезенхімальні клітини жирової тканини.

Feng X. та співавтори [168] дослідили вплив тромбоцитарного лізату на мезенхімальну диференціацію клітин пуповинної крові. Автори вказують, що 10 %-й тромбоцитарний лізат може поліпшити диференціацію пуповинних мезенхімальних клітин у хондроцити. Zaky S.H. та співавтори [299] виявили найкраще утворення хрящової популяції в середовищі, що містило лише PRP.

Застосування PRP передбачає кратне збільшення концентрації факторів росту в точці прикладання для забезпечення швидкого та повноцінного процесу регенерації, особливо при застосуванні на тканинах організму з вихідним низьким потенціалом до регенерації чи недостатнім кровопостачанням (наприклад, це нервова тканина, хрящ). Уже доведено високу ефективність

біологічних препаратів на основі збагаченої тромбоцитами плазми в лікуванні спортивних травм, при операціях, зокрема і на суглобах, а також в стоматології та косметології. Повідомляють про позитивний досвід застосування PRP у ревматології при хронічних тендинітах колінного, ліктьового і гомілковостопного суглобів, в лікуванні псевдоартрозу, артриту, синовіту, ушкодженнях менісків і суглобового хряща. Отже, терапія тромбоцитарною плазмою застосовується як самостійний метод або як додаток під час лікування в багатьох галузях медицини (косметологія, щелепно-лицьова хірургія, ортопедія, хірургія, тощо).

Отже, збагачена тромбоцитами плазма крові має виражений мітогенний вплив на мезенхімальні клітини. При цьому вплив цей неоднорідний, що, скоріше за все, зумовлено різними техніками приготування PRP. Окрім вираженого мітогенного впливу, тромбоцитарна плазма має значний протизапальний ефект.

Основним механізмом пошкодження при травматичному ушкодженні є генерація активних форм кисню, які активують пероксидне окислення ліпідів. Враховуючи недостатність системи антиоксидантного захисту відбувається системне пошкодження клітинних мембран внаслідок пероксидації їх ліпідного шару. Травматичне ушкодження м'язової тканини знижує життєздатність клітин в місці ушкодження, що підтверджується морфологічними змінами.

Оксидативний стрес, що розвивається при травмах, супроводжується гіперпродукуванням вільних радикалів на фоні виснаження ендogenous антиоксидантних резервів. Також при травмі все більш експериментальні та клінічні дані свідчать про те, що тромбоцити визначають як відповідні модулятори інших фізіопатологічних процесів, включаючи запалення та регенерацію тканин. Ці явища опосередковуються за рахунок вивільнення факторів росту, цитокінів та позаклітинних матрицевих модуляторів, які послідовно сприяють реваскуляризації пошкодженої тканини за рахунок індукції міграції, проліферації, диференціювання та стабілізації ендотеліальних клітин у нових кровоносних судинах; відновлення пошкодженої сполучної

тканини шляхом міграції, проліферації та активації фібробластів; та її проліферацію та диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин на клітинні типи клітин. З цих причин похідні плазми, багаті тромбоцитами, використовуються в регенеративній медицині для лікування декількох клінічних станів, включаючи виразки, опіки, відновлення м'язів, кісткові захворювання та відновлення тканин після операції.

Дослідженню цих процесів, а також їх змін на тлі корекції збагаченої тромбоцитами плазми присвячений наступний розділ нашої роботи.

Згідно проведених досліджень нами встановлено, що внаслідок травматичного ушкодження м'язів стегна гіперактивація процесів ліпідної пероксидації спостерігається вже на 1-шу добу, зростаючи до 7-ої доби посттравматичного періоду порівняно з тваринами без змодельованої патології.

Вивчення динаміки прооксидантно/антиоксидантного статусу в посттравматичному періоді показало, що у посттравматичному періоді показник ДК зростає протягом усього експерименту у разі порівняно з інтактними тваринами. Концентрація проміжного продукту ліпідної пероксидації – МДА зростала аналогічно.

За умов експериментальної корекції з використанням PRP відбувається пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що веде до зниження рівня продуктів ПОЛ. Показник ДК на 1-шу добу спостереження суттєво не відрізнявся від аналогічного показника тварин, яким корекцію не проводили, проте з 7-ої добу достовірно зменшився від показника тварин без корекції, а на 21-шу добу достовірно не перевищував рівень тварин без змодельованої патології. Концентрація МДА у тварин, яким проводили корекцію, також знижувалась, проте дещо менше, ніж рівень ДК. Варто зазначити, що до 21-ої доби показник МДА все ж був достовірно вищим, ніж у тварин, яким моделювання травми не проводилось

За умови корекції PRP відбувається зростання активності ферментів антиоксидантної системи, але переважна більшість з них не досягає рівня показників контрольної групи. На нашу думку, корекція м'язової травми

збагаченою тромбоцитами плазмою посттравматичного періоду, супроводжувалась зменшенням оксидативного ушкодження міоцитів.

Показник АПІ, який вказує на наявний баланс прооксидантних і антиоксидантних механізмів, не нормалізувався у групах піддослідних тварин до кінця часу проведення експерименту. Такі результати вказують на те, що травматичне ушкодження м'язів викликає тривалі системні зміни та дисбаланс адаптаційно-компенсаторних механізмів, спрямованих на ліквідацію патологічних чинників.

Аналізуючи динаміку змін показника АПІ було встановлено, що у групі тварин з м'язовою травмою, яким корекцію не проводили він був меншим на порівняно з тваринами без змодельованої патології. У групі тварин, яким проводили корекцію з використанням PRP показник АПІ зріс порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили.

У першій групі АПІ, який вказує на баланс прооксидантних та антиоксидантних механізмів, не нормалізувався до кінця експерименту. У другій групі збагачена тромбоцитами плазма крові зменшує оксидативний стрес і має тенденцію до нормалізації співвідношення між оксидантною та прооксидантно системами.

Отже, за умови травми м'язів виникає значний дисбаланс прооксидантних і антиоксидантних механізмів, про що свідчить динаміка антиоксидантно-прооксидантного індексу, який до 21-ої доби спостереження знижувався у першій групі, а в групі де призначали PRP він зростав та наближався до контролю.

За умови травми м'язів руйнується цілісність плазматичної мембрани міоволокна та базальної пластинки, що веде до зростання в клітині рівня позаклітинного кальцію та у підсумку призводить до деградації м'язових білків та некрозу. Клітини запалення, які сприяють очищенню та відновленню некротичної тканини, домінують у місцевій реакції на пошкодження. Ці клітини вивільняють розчинні молекули, головним чином цитокіни, які, як правило, функціонують як міжклітинні месенджери в аутокринному режимі,

зв'язуючись із клітиною свого походження, або в паракринному режимі, зв'язуючись із рецепторами сусідньої клітини-мішені. Оскільки цитокіни діють не тільки локально, тому місцеве запалення супроводжується системною реакцією. При цьому, за умови значного пошкодження м'язів порушення балансу між про- та протизапальною реакцією може спричинити генералізовану відповідь, яка, у свою чергу, може зумовити поліорганну недостатність.

В механізмах індукції загоєння м'язової тканини збагаченою тромбоцитами плазмою крові основну функцію виконують фактори росту, яких на даний час відомо понад: тромбоцитарний фактор росту, трансформуючий фактор росту – 1, тромбоцитарний фактор ангіогенезу, інсуліноподібний фактор росту, остеокальцин, остеонектин, фібриноген та інші. Їх дія проявляється локально за рахунок залучення недиференційованих клітин до нового сформованого матриксу і запуску клітинного ділення в ділянці ушкодження. Однак ці механізми потребують уточнення та додаткового вивчення.

Показники прозапальних цитокінів сироватки крові у щурів, яким моделювали травму м'язів, були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології. Так, концентрація ІЛ-1 β на 1-шу добу після нанесення травми був достовірно вищою від показника тварин без змодельованої патології у 2,4 рази. Аналогічні зміни були відмічені і стосовно інших прозапальних цитокінів. Зокрема, показник TNF- α у цей термін спостереження був у 2,6 рази а ІЛ6 – у 2,4 рази вищим, ніж у тварин, яким травми не моделювали. В обох випадках різниця між показниками була достовірною. На 7-му добу концентрація ІЛ-1 β дещо знизилася, однак перевищувала рівень тварин без змодельованої патології в 1,8 рази. Зміни показників TNF- α та ІЛ-6 мали аналогічну спрямованість і на 7-му добу від моменту нанесення травми перевищували відповідно у 2,0 й 1,9 разів показники тварин без змодельованої патології. До 14-ої доби концентрація досліджуваних прозапальних цитокінів залишалася практично на тому ж рівні, що й у попередній термін спостереження, однак все ж вірогідно перевищували рівень тварин без

змодельованої патології відповідно. До 21-ої доби концентрації досліджуваних прозапальних цитокінів сироватки крові зменшувались, проте були достовірно вищими від норми, зокрема, концентрація IL-1 β в 1,6 рази, TNF- α в 1,4 рази та IL-6 в 1,3 рази.

Аналізуючи динаміку зміни концентрації прозапальних цитокінів варто відмітити їх односпрямованість, зокрема, максимальне зростання на першу добу, незначне зниження та коливання практично на одному рівні протягом 7-ми – 14-ти діб та зниження до 21-ої доби.

Концентрація протизапального IL-10 вірогідно зростала на 1-шу добу (в 1,6 рази), тоді як на 7-му добу зменшувалась, статистично значимо не відрізняючись від показників інтактної групи. Варто зазначити, що на 14-ту добу концентрація даного цитокіну була менша в 1,5 рази стосовно даних тварин без змодельованої патології і залишалася практично на тому ж рівні, що й у попередній термін спостереження, до 21-ої доби.

За даними Чорноморець П.М. та Нурищенко Н.Є., специфічною особливістю м'язового запалення є здатність самих м'язових волокон до секреції медіаторів запалення, зокрема, IL-1 β , TNF- α та IL-6, які є хемотактичними агентами для нейтрофілів та інших імунокомпетентних клітин, внаслідок чого лейкоцити мігрують до пошкодженої ділянки м'яза та зумовлюють розвиток запалення [87]. Патогенетично слід зазначити гіперпродукцію активних форм кисню нейтрофілами та активацію процесів вільнорадикального окиснення у локусі запалення, що є типовим патологічним процесом та ключовим пошкоджуючим чинником.

Застосування плазми крові, збагаченої тромбоцитами, супроводжувалось зменшенням концентрації прозапальних цитокінів сироватки крові. Збагачена тромбоцитами плазма містить фібрилярний і клітинний компоненти та здатна діяти як носій клітин, які важливі для регенерації м'язових і кісткових тканин [15]. Так, концентрація IL-1 β на 1-шу добу від моменту нанесення травми у тварин цієї групи перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 1,8 рази, однак був на 29,3 % меншим, ніж у тварин, яким моделювали травму,

але корекції не проводили. Концентрація TNF- α також перевищував рівень здорових тварин у 2,1 рази, що, однак, на 21,0 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мала також концентрація IL-6 – показник був 1,8 рази вищим, ніж в нормі, проте меншим від рівня тварин без корекції на 29,6 %.

На сьому добу експерименту не спостерігалось нормалізації прозапальних цитокінів. Зокрема, концентрація IL-1 β була вищою від показника тварин без змодельованої патології в 1,5 рази та на 20,4 % меншим, ніж аналогічний показник тварин без корекції. Концентрація TNF- α та IL-6 за спрямованістю були майже аналогічним до показника IL-1 β , перевищуючи норму відповідно в 1,7 та 1,6 рази, причому обидва показники були достовірно меншими, ніж у травмованих тварин, яким корекцію не проводили – на 21,8 та 19,0 % відповідно. Варто відмітити, що на 14-ту добу після PRP корекції концентрація прозапальних цитокінів практично не відрізнялася від даних попередньої групи спостереження.

Більш виразне зниження прозапальних цитокінів ми встановили на 21-шу добу експерименту. Так, у цей термін спостереження концентрації IL-1 β , TNF- α та IL-6 перевищували рівень тварин без змодельованої патології в 1,2 рази. При цьому концентрація TNF- α та IL-6 були відповідно на 30,5 %, 21,9 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції.

Застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові, супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації IL-10 стосовно тварин без змодельованої патології та травмованих тварин, яким корекцію не проводили на першу добу експерименту. На сьому добу досліджуваний показник знижувався в 1,1 рази відносно даних травмованих тварин, яким корекцію не проводили, проте був вірогідно вищий даних інтактної групи, тоді як у наступні терміни спостереження (14-та і 21-ша доби) практично не відрізнявся від контролю.

Порівнюючи отримані дані до та після корекції можна зробити висновок щодо протизапального ефекту PRP, який характеризувався зниженням концентрації прозапальних цитокінів, які посилено продукуються при

запальному процесі у відповідь на травму м'язів у всі терміни спостереження, та гіперпродукцією протизапального IL-10, який може пригнічувати вироблення TNF- α та послаблювати його негативні ефекти.

За даними P. Vendinelli та співавт. (2010) протизапальний ефект PRP реалізується шляхом редукції експресії COX2 і CXCR4 генів, які беруть участь в реакціях запалення [207]. При цьому, інші наукові дані засвідчують аналгетичні властивості PRP, їх здатність зменшувати набряки м'яких тканин при травмах різного генезу, вплив на ангиогенез та неоваскуляризацію [112, 115].

Отже, у тварин з механічною травмою м'язів стегна спостерігається підвищення концентрації IL-1 β , TNF- α та IL-6 сироватки крові (з максимумом на першу добу) на тлі виснаження протизапальних резервів (зниження концентрації IL-10 з 14-ої доби експерименту). Застосування плазми, збагаченої тромбоцитами, зменшує прозапальний ефект цитокінів шляхом зниження їх концентрації, починаючи з першої доби експерименту.

Порушення протеїназо-інгібіторної системи відіграють важливу роль у патогенезі багатьох патологічних станів. Реакції лімітованого (обмеженого) протеолізу мають місце у процесі утворення активних форм ензимів з неактивних попередників, а також синтезі гормонів, структурних білків, ряду білків плазми крові, утворенні та інактивації біоактивних пептидів (кініни, нейропептиди), що беруть участь в регуляції судинного тону, процесів мікроциркуляції, функції мозку тощо. Різноманітний спектр фізіологічної дії протеїназ, їх висока активність стосовно білкових субстратів зумовлюють складність механізмів регуляції цих процесів в організмі. Серед факторів, що визначають біологічну активність протеїназ можна назвати концентрацією ферменту і субстрату, рН, іонною силою і температурою. Проте, однією з найбільш важливих ланок контролю за протеолізом є вміст у крові та тканинах специфічних білків і інгібіторів протеолітичних ферментів, зокрема α_1 -інгібітора протеїназ, α_2 -макроглобуліну, антитромбіну III, α_2 -антиплазміну, α_1 -

антихімотрипсину, які утворюють комплекси з протеїназами, знижуючи при цьому їх активність.

За фізіологічних умов активність протеолітичних ферментів урівноважена із рівнем інгібіторів протеїназ. При критичних станах відбувається порушення динамічної рівноваги між протеазами та їх інгібіторами. Збільшення кількості та активності ферментів протеолізу тканинного походження веде до «протеазного вибуху», у зв'язку з чим гіперактивуються згортальна, фібринолітична, калікреїн-кінінова, ренін-ангіотензин-альдостеронова системи і комплемент. Викликані зміни зумовлюють розвиток деструктивних і запальних змін у всьому організмі.

За дії різних патогенних чинників спостерігається значне підвищення активності протеолітичних ферментів, і вони з фактора регуляції перетворюються на чинник пошкодження. Однією з причин, які зумовлюють цю трансформацію, є зниження активності ендогенних інгібіторів протеїназ і підвищення проникності лізосомальних мембран.

Показники протеолітичної активності сироватки крові у щурів, яким моделювали травму м'язів, були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології. Так, лізис азоальбуміну на першу добу після нанесення травми був достовірно вищим від показника тварин без змодельованої патології у 7,6 рази. Аналогічні зміни були відмічені і стосовно лізису азоказеїну та азоколу. Зокрема, показник лізису азоказеїну у цей термін спостереження був у 10,3, а лізис азоколу – у 7,7 разів вищим, ніж у тварин, яким травми не моделювали. В обох випадках різниця між показниками була достовірною. На сьому добу показник лізису азоальбуміну дещо знизився, однак перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 4,6 рази. Зміни показників лізису азоказеїну та азоколу мали аналогічну спрямованість і на 7-му добу від моменту нанесення травми склали відповідно 843,5 та 514,8 % від показників тварин без змодельованої патології. До 14-ої доби показник лізису азоальбуміну залишався практично на тому ж рівні, що й у попередній термін спостереження, а показники азоказеїну та азоколу знижувались, однак все ж

перевищували рівень тварин без змодельованої патології відповідно у 6,1 та 2,6 рази відповідно. До 21-ої доби усі показники, що характеризують стан протеолітичної активності сироватки крові зменшувались, проте були достовірно вищими від норми. Так, лізис азоальбуміну склав 330,7 %, азоказеїну – 329,1 %, азоколу – 265,4 % від аналогічних показників здорових тварин.

Застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові супроводжувалось зменшенням протеолітичної активності сироватки крові. Лізис азоальбуміну на 1-шу добу від моменту нанесення травми у тварин цієї групи перевищував рівень тварин без змодельованої патології в 5,8 рази, однак був на 30,5 % меншим, ніж у тварин. Яким моделювали травму, але корекції не проводили. Лізис азоказеїну також перевищував рівень здорових тварин у 8,9 рази, що, однак, на 16 % менше, ніж у тварин без корекції. Аналогічну спрямованість мав також лізис азоколу – показник був 5,3 рази вищим, ніж в нормі, проте меншим від рівня тварин без змодельованої патології на 44,4 %.

На 7-му добу експерименту, не спостерігалось нормалізації протеолітичної активності. Зокрема, лізис азоальбуміну був вищим від показника тварин без змодельованої патології в 3,9 рази та на 17,8 % меншим, ніж аналогічний показник тварин без корекції. Показники лізису азоказеїну та азоколу за спрямованістю були майже аналогічним до показника азоальбуміну, однак в цифровому вимірі відрізнялися. Зокрема, показник азоказеїну перевищував норму у 7,1 рази, а азоколу – у 2,7 рази, причому обидва показники були достовірно меншими, ніж у травмованих тварин, яким корекцію не проводили – на 18,8 та 93,9 % відповідно.

Встановлено значне зниження протеолітичної активності на 14-ту добу експерименту. Лізис азоальбуміну у цей термін спостереження перевищував рівень тварин без змодельованої патології у 4 рази і був на 24,7 % меншим, ніж у травмованих тварин без корекції. Лізис азоказеїну був дещо вищим – перевищення стосовно здорових тварин склало 4,2 рази, що на 44,1 % менше, ніж у тварин без корекції. Лізис азоколу був ще меншим – 192 % від показника

тварин без змодельованої патології і на 35,2 % менше, ніж у травмованих тварин, яким корекція не проводилась. До 21-ої доби активність протеолітичних процесів суттєво знизилась. Показник лізису азоальбуміну перевищував аналогічний показник інтактних тварин в 1,7 рази, що на 93,6 % менше, ніж у тварин без корекції. Лізис азоказеїну перевищував контроль в 1,7 рази, азоколу – в 1,5 рази.

Отже, застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові сповільнювало активність процесів протеолізу, що може мати суттєве значення для пришвидшення процесів регенерації м'язової тканини, ушкодженої внаслідок механічної травми. Вміст білкових інгібіторів плазми крові також зазнавав виражених змін. На першу добу спостереження встановлено достовірне підвищення інгібіторного потенціалу крові тварин, яким моделювали травматичне ушкодження м'язів. . Зокрема, концентрація α_1 -ІІІ, збільшилася в 2,1 рази. Щодо, α_2 -МГ то його концентрація теж зросла, однак дещо менше – в 1,8 рази порівняно з тваринами без змодельованої патології. Виразне збільшення вмісту α_1 -ІІІ може бути зумовлене його підвищеною продукцією паралельно з гіперпродукцію інших гострофазових білків у відповідь дію травматичного чинника. Крім того, підвищення активності основних білкових інгібіторів можна розцінювати як неспецифічну захисну реакцію організму на посилений протеоліз та запуск фізіологічних процесів адаптації у відповідь на підвищення протеолітичної активності крові. Менш виразне зростання інгібіторного потенціалу, поряд із суттєвим зростання протеолітичної активності, відобразилося на значенні індексу протеолізу – він зріс у 4,2 рази. На сьому добу концентрація α_1 -ІІІ перевищувала рівень тварин без патології на 24,2 %, а α_2 -МГ – на 66,4 %. Однак, зважаючи зростання у цей період протеолітичної активності крові, індекс протеолізу зріс і був вищим у 4,9 рази від показника інтактних тварин. На 14-ту добу від моменту нанесення механічної травми м'язів вміст білкових інгібітор у сироватці крові суттєво зменшився. Концентрація α_1 -ІІІ склала 112,3 % відносно тварин без патології, а α_2 -МГ – 133,6 %, що вказує на виснаження антипротеазних резервів крові. Це є

одним з чинників, що не дозволяють нормалізувати активність процесів протеолізу на тлі високої активності протеолітичних ензимів, на що вказує достовірне зростання ІІ у 4,5 рази. До 21-ої доби показники інгібіторів протеаз і надалі знижувались – концентрація α_1 -ІІ була меншою, ніж в інтактних тварин (95,0 %), а α_2 -МГ перебувала на рівні тварин без травми. Однак нормалізація концентрації антипротеаз не корелювала з активність протеолітичних ензимів, тому індекс протеолізу все ж був достовірно вищим, ніж у нормі і склав 261,3 %.

Застосування коригуючого чинника супроводжувалось суттєвим зсувом співвідношення протеази/інгібітори протеаз у бік переважання процесів інгібування протеолізу. Вже на першу добу спостереження вміст обох ключових інгібіторів протеолізу достовірно знижувався як стосовно тварин без змодельованої патології, так тварин, яким корекцію не проводили. Однак, на тлі зростання протеолітичних процесів у цей термін спостереження спостерігалось навіть більш виразне зростання ІІ – в 4,3 рази порівняно з інтактними тваринами і на 4 % – порівняно з тваринами без корекції. На 7-му добу, ми відмітили подальше зниження інгібіторної активності сироватки крові порівняно з попереднім терміном, однак індекс протеолізу був значно меншим, ніж у групі тварин без корекції. На 14-ту добу інгібіторний потенціал крові знижувався повільніше, ніж фактори протеолізу, що спричинилося до більш суттєвого зниження інгібіторного потенціалу крові, порівняно з тваринами без застосування коригуючого чинника. Індекс хоча і перевищував аналогічний показник інтактних тварин у 2,9 рази, проте був меншим від показника тварин без корекції в 1,5 рази. На 21-шу добу експерименту концентрація α_1 -ІІ досягнула рівня інтактних тварин, а α_2 -МГ навіть перевищувала її. При цьому індекс протеолізу також суттєво знизився відносно інтактних тварин, а також тварин, яким корекцію не проводили.

Дослідження загальної активності маркерного ферменту лізосомального матриксу катепсину D показало, що моделювання механічної травми м'язів призвело до достовірного зростання загальної активності катепсину D на першу

добу експерименту у 3,7 рази з подальшим її зниженням у подальші терміни спостереження відносно тварин без змодельованої патології, що вказує на стабілізацію лізосомальних мембрану динаміці патологічного процесу. До 21-ої доби показник перевищував рівень інтактних тварин на 24,5 %. У тварин, яким на тлі змодельованої травми проводили корекцію спостерігали більш помірне зростання активності катепсину D на усіх етапах розвитку патологічного процесу, порівняно з групою тварин, яким корекцію не проводили. Уже до 14-ої доби показник відрізнявся від норми лише на 17,5 % і також був достовірно меншим, ніж у групі без корекції. На 21-шу добу активність катепсину D достовірно не відрізнялась від аналогічного показника інтактних тварин і тварин без корекції.

Отже, у тварин з механічною травмою м'язів стегна спостерігається інтенсивне зростання протеолітичної активності крові на тлі менш виразного зростання антипротеазної активності, а також зростання проникності лізосомальних мембран. Це призводить до значного дисбалансу у системі протеази/антипротеази і зростання індексу протеолізу. Застосування плазми, збагаченої тромбоцитами, зменшує цей дисбаланс, що супроводжується зниженням індексу протеолізу особливо у більш пізні терміни після нанесення травми.

Однією із систем організму, яка зазнає значних змін при політравмі, є система детоксикації. Порушення функціонування цієї системи призводить до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації, який супроводжує захворювання і ускладнення, пов'язані з підвищеним розпадом тканин, посиленням процесів катаболізму, недостатністю функції внутрішніх органів [2, 7, 18]. Маркерами ендогенної інтоксикації вважають молекули середньої маси, еритроцитарний індекс інтоксикації, які є доказовими та швидкими у виконанні [2, 7, 141]. На сьогоднішній день залишається до кінця не з'ясованими вікові механізми розвитку СЕІ, немає досконалих патогенетичних підходів до пояснення і прогнозування ранніх та пізніх наслідків політравматичного ураження.

Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення динаміки показників ендогенної інтоксикації у щурів з травматичним ураженням м'язів.

Як показали отримані нами результати, при травмі показники МСМ1 та МСМ2, які відображали, відповідно, вміст ланцюгових і ароматичних амінокислот у середньомолекулярних пептидах та продуктах їх розпаду, були підвищені на 1-шу добу після нанесення травми. Так, вміст МСМ1 в крові уражених щурів зріс у 2,3 рази порівняно з інтактними тваринами, а вміст МСМ2 в крові щурів збільшився відповідно у 2,8 рази відносно інтактних тварин. Найбільш виражені зміни щодо вмісту обох фракцій МСМ спостерігали через 24 години з моменту травми. Через сім днів після травми спостерігалась незначна тенденція до зменшення вмісту МСМ. Таким чином, під впливом травми відмічалось збільшення концентрації в крові як МСМ1, так і МСМ2. Причому, зростання МСМ було значнішим для пулу МСМ2, що вказує на виражене збільшення ароматичних амінокислот у складі фракції середніх молекул. Оскільки МСМ – маркери ендотоксикозу, то різке зростання їх вмісту вказує на пік розвитку та генералізації синдрому. Інтоксикаційний синдром спричинений травмою супроводжується і спричиняє підвищений розпад тканин, посилення катаболічних процесів, внаслідок накопичення надлишкової кількості біологічно активних речовин, деформованих білкових метаболітів та інших токсичних речовин ендогенного походження. Накопичення МСМ є не тільки маркером ендотоксикозу, в подальшому вони посилюють перебіг патологічного процесу, набуваючи ролі вторинних токсинів, впливаючи на життєдіяльність всіх систем і органів. Показник рівня МСМ вважають основним біохімічним маркером, що відображає рівень патологічного білкового метаболізму. Ендотоксикози є закономірним наслідком несприятливого впливу зазначеного чинника на органи і системи організму в цілому і характеризуються неспецифічним синдромом ендогенної інтоксикації [3, 10, 11].

Підвищення вмісту МСМ1, до складу яких можуть входити олігопептиди, фрагменти нуклеїнових кислот, вищих жирних кислот, триацилгліцеролів,

холестеролу, свідчить про порушення структури мембран гепатоцитів, а МСМ2, компонентами яких можуть бути пуринові основи, сечова кислота, та ароматичні амінокислоти – про пригнічення детоксикуючої функцій печінки та деструктивні зміни в м'язовій тканині [1, 7].

Як видно з результатів досліджень, одночасно із збільшенням у посттравматичному періоді рівня МСМ, зростає і сумарний токсичний вплив на мембрани еритроцитів, який проявлявся в достовірному підвищенні ЕП у всі терміни спостереження.

Саме в них ступінь деструкції мембран еритроцитів (ступінь поглинання барвника) протягом експерименту був найвищим. Ці зміни, очевидно, викликані тим, що при дії травми на організм, порушується енергетичний обмін і транспорт речовин в еритроцитах, зростає проникність їх мембран та збільшується сорбційна здатність.

Базуючись на аналізі показників клітинного складу крові, розраховано ЛШ на початку експерименту та в різні його терміни. У результаті проведеного дослідження встановлено неоднозначну реакцію лейкоцитарної відповіді на розвиток патологічних процесів.

Отже, отримані в результаті експериментального дослідження свідчать про те, що в результаті травми м'язів розвивається ендотоксикоз, свідченням чого є нагромадження ендотоксинів в організмі тварин, на що вказують виражені зміни еритроцитарного та лейкоцитарного індексів інтоксикації та вмісту молекул середньої маси.

Проведені гістологічні та морфометричні зміни м'язів у ранньому посттравматичному періоді показали, що при моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 1-шу добу в ділянці пошкодження було виявлено гострі розлади кровообігу з вогнищевим руйнуванням судин, зруйновані м'язи, просочені еритроцитами, набряк оточуючих волокон, тканинні детрити, незначну кількість лімфо- та гістіоцитів, тучних клітини, поодинокі сегментоядерні лейкоцити та значну кількість фібрину. Провівши морфометричний аналіз м'язових волокон на 1-шу добу після травматичного

ушкодження м'язу встановили, що площа ушкоджених м'язів переважала площу неушкоджених тканин. Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження показало, що при травматичному ушкодженні м'язів в м'язових структурах переважали явища набряку та пошкодження тканини. Місцями навколо м'язів спостерігались фрагменти колагенових волокон із ознаками мукоїдного набряку, дещо хаотичного ходу фібрил, серед яких визначались еритроцити, лімфоцити та лейкоцити.

При застосуванні PRP на 1-шу добу спостереження було виявлено в ділянці пошкодження розширення та повнокров'я судин, гостру запальну реакцію навколо судинної стінки, проте значний периваскулярний набряк строми не візуалізувався. В пошкоджених м'язах візуалізувались некротичні зміни. Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів була незначною, а кількість ушкоджених м'язових волокон переважала, однак показник був на 10 % меншим, ніж у тварин яким не проводилась корекція. Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження м'язів на фоні корекції PRP встановило, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів візуалізувався виражений набряк строми, насичений мізерними фракціями колагенових волокон, які розташовувались переважно хаотично.

Застосування МСК на моделі травматичного ушкодження м'язів на 1-шу добу в ділянці травмування було виявлено переважно повнокров'я судин у поєднанні із гострою запальною реакцією навколо судинної стінки, у поєднанні із периваскулярним набряком та некротично зміненими міоцитами. Морфометрично виявлено, що площа неушкоджених м'язів практично не відрізнялась від групи досліджень при корекції PRP, а кількість ушкоджених м'язових волокон дещо переважала.

На 7-му добу у тварин, які не отримували лікування, в ділянці пошкодження виявлялись м'язові волокна із фрагментами деструкції у вигляді аморфних мас, окремі із формуванням контрактур. Ядра слабо візуалізувались або були відсутніми. Поміж м'язовими волокнами зустрічались поодинокі клітини фібробластичного ряду та макрофаги. В зоні формування грануляцій

також збільшувалась кількість фібробластів. Морфометричний аналіз ділянки ушкодження на 7-му добу експерименту показав, що площа неушкоджених м'язів дещо зростала, при цьому і кількість ушкоджених м'язових волокон також збільшувалась, що складало 65 % порівняно із аналогічною групою на 1-шу добу. В цей період візуалізувались ділянки регенерації.

Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження показало, що переважно колагенові волокна реструктуровані, розташовані хаотично із вираженим набряком із порушенням ходу та фрагменти пухкої сполучної тканини, серед яких судини мікроциркуляторного русла.

Застосування PRP показало, що в ділянці пошкодження значна частина м'язових волокон залишались збереженою, про що свідчить наявність ядер та стан саркоплазми. Проте локація окремих була дещо зміненою. Поряд із цим спостерігались помірні дистрофічні зміни у досліджуваних структурах. Волокна оточені значною частиною колагену із ознаками набряку.

Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів на 23 % перевищувала показник групи досліджень без корекції. Дещо меншою, ніж у попередній групі є і площа пошкоджених м'язових волокон, яка становить, що свідчить про зменшення впливу пошкоджуючого фактора і становить 6 %. При гістохімічному дослідженні ділянки пошкодження м'язових волокон у зоні формування грануляційної тканини було виявлено накопичення колагенових волокон та незначної кількості еластичних волокон у другій групі. Застосування МСК показало збільшення відсотку неушкоджених волокон в ділянці травми на 15 % збільшення кількості ушкоджених м'язових волокон на 26 % та збільшення кількості регенеруючих волокон на 9 %.

У пізньому посттравматичному періоді гістологічні та морфометричні зміни м'язів також мали свої особливості. Зокрема, на 14-ту добу в ділянці пошкодження візуалізувалась сформована колагенова строма з помірним набряком, насичена клітинами як фібробластичного ряду так і лімфоцитами та плазмоцитами. В частини м'язових волокнах спостерігались прояви білкової дистрофії, проте некротичні зміни були значно меншими. Інтенсивність

сприйняття барвників саркоплазмою зростала. Морфометричний аналіз показав, що площа неушкоджених волокон збільшувалась порівняно із 7-ою добою. Збільшувалась також кількість регенеруючих м'язових волокон. При гістохімічному дослідженні ділянки травматичного пошкодження м'язових волокон візуалізуються переважно колагенові волокна із ознаками значного набряку. Незначна частина м'язових структур із дистрофічно-некротичними змінами, частина волокон із проявами посиленої регенерації.

Проведення корекції PRP показало, що в ділянці пошкодження візуалізувалось зменшення площі колагенової стромі, виражене зменшення набряку, значної кількості клітин фібробластичного ряду та формування нових судин мікроциркуляторного русла. В окремих м'язових волокнах подекуди спостерігались прояви білкової дистрофії, проте некротичні зміни практично не візуалізувались. Корекція PRP у тварин другої групи значно збільшувала відсоток неушкоджених волокон, зменшувалась кількість ушкоджених волокон на 14 %, однак вплив на регенераторну активність був незначним. Застосування МСК збільшувало кількість неушкоджених волокон, проте у меншій мірі, ніж PRP; кількість ушкоджених м'язових волокон зменшувалась лише на 3 % порівняно із групою контролю, а кількість регенеруючих волокон майже не відрізнялась від показника тварин із застосуванням PRP.

Гістохімічне дослідження ділянки пошкодження встановило на 14-ту добу експерименту значно зростала кількість регенеруючих м'язових волокон у тварин без проведення корекції. Такі прояви очевидно підтверджують значний відсоток ушкоджених м'язових волокон під час експерименту. При застосуванні PRP добре візуалізуються колагенові та еластичні волокна, пухка сполучна тканина. Еластичні волокна більш сформовані навколо судин та в навколо м'язовій стромі.

При моделюванні травматичного ушкодження м'язів на 21-шу добу в ділянці пошкодження візуалізувались зменшення площі загальної клітинної інфільтрації, формування капілярної сітки в ділянці грануляцій, дрібно вогнищеву перивакулярну лімфо-плазмоцитарну інфільтрацію. Візуально

зменшувалась кількість фібробластів та тучних клітин. Проте помірний вогнищевий периваскулярний набряк переважав у ділянках проекції м'язових волокон. Інтенсивність сприйняття саркоплазмою барвників не зростала.

Морфометричний аналіз встановив, що площа неушкоджених м'язів на 21-шу добу експерименту становила на 8 % відрізняється від показника на 14-ту добу дослідження. Серед них візуалізуються частина волокон із різними ознаками пошкодження їх площі. Разом із тим зменшувалась кількість регенеруючих волокон, очевидно що в цей посттравматичний період структурні зміни у м'язових волокнах уже відбулись. Гістохімічний аналіз ділянки пошкодження встановив, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів добре візуалізуються колагенові та еластичні волокна, які ставали більш структурованими, компактними; зменшувалась площа ділянки пошкодження. Проте все ще залишався виражений набряк строми, який поширювався по ходу волокон та в між м'язовому інтерстиції. При корекції PRP в ділянці пошкодження пухкі колагенові волокна заміщувались гіалінізованою стромою. Різко зменшувалась кількість лімфо– та плазмоцитів, фібробластів, тучних клітин та практично зникав периваскулярний набряк. Чітко збереженими візуалізувались судини мікроциркуляторного русла. Покращувалась структура самих м'язових волокон: саркоплазма інтенсивніше сприймала барвники, ядра відновлювали свою локалізацію. Морфометричний аналіз показав достовірні показники посилення регенерації м'язових волокон при застосуванні PRP. Зменшення кількості регенеруючих волокон при застосуванні МСК, очевидно, зумовлене збереженням даних структур до 21-ої доби дослідження. Незначне збільшення кількості ушкоджених волокон при застосуванні МСК зумовлене загальним впливом на організм даного засобу. Порівнюючи площу пошкоджених волокон в ділянці травми на 14-ту та 21-шу доби встановлено, що у тварин яким не проводилась корекція PRP кількість м'язових волокон, які зазнали різного роду деструкції була достовірно більшою, ніж у тварин, яким проводилась корекція PRP. Гістохімічний аналіз ділянки пошкодження встановив, що в ділянці травматичного ушкодження м'язів чітко візуалізуються

сформовані колагенові та еластичні волокна, які ставали більш структурованими, адаптованими до функціонування м'язами; різко зменшувалась площа ділянки пошкодження, практично не візуалізувався набряк як в ділянці травми так і між м'язовою інтерстицією, і такі прояви спостерігались при місцевому застосуванні PRP.

Проведений аналіз патоморфологічних змін легень, печінки та нирок, які виникали внаслідок механічної травми м'язів та за проведеної корекції показав, що на 1-шу добу після моделювання травматичного ушкодження м'язів у досліджуваних нами органах розвиваються дистрофічні зміни у всіх епітеліальних компонентах, проте найбільш вираженими вони є в печінці та легнях. В легнях наростали розлади кровообігу у поєднанні із помірною лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією стромы до 14-ої доби і дещо зменшувались до 21-ої доби. В печінці порушувалась часточкова структура, наростали виражені дистрофічні зміни переважно до 14-ої доби і дещо зменшувались прояви до 21-ої доби. В нирках наростали розлади кровообігу як в кірковому так і в мозковому шарі, виникали дистрофічні зміни епітелію вивідних каналців.

Застосування PRP та МСК має в різній мірі протекторний ефект уже із 1-ої доби застосування. Застосування PRP проявляє переважно місцевий для корекції загоєння травматичного ушкодження м'язів, покращує відновлення структур в ділянці рани та має поверхневий вплив на відновлення епітеліального компоненту паренхіматозних органах, переважно у віддалені періоди.

Кращі показники відновлення м'язових волокон у тварин, яким проводили корекцію PRP на 14-ту та 21-шу доби експерименту за рахунок зменшення кількості пошкоджених волокон, збільшення кількості регенеруючих волокон, зменшенням проявів запальної реакції, набряку та ущільнення колагенової стромы в ділянці пошкодження. Застосування МСК проявляє більш загальний протекторний вплив на структуру пошкоджених переважно епітеліальних структур паренхіматозних органів.

ВИСНОВКИ

1. В умовах травматичного ушкодження м'язів виникає значний дисбаланс прооксидантних і антиоксидантних механізмів, що проявляється гіперактивацією процесів ліпідної пероксидації уже на ранніх етапах посттравматичного періоду (зростання МДА та ДК), зниження активності СОД та незначного зростання катальної активності крові, що призводить до зниження антиоксидантно-прооксидантного індексу. За умов корекції з використанням PRP відбувається пригнічення активності вільнорадикальних процесів, що веде до зниження рівня продуктів ПОЛ, зростання активності антиоксидантних ферментів та зростання антиоксидантно-прооксидантного потенціалу (на 1-шу добу – на 13,4 % ($p<0,05$), 7-му – на 14,4 % ($p<0,05$), 14-ту – на 12,9 %, 21-шу – на 25,4 % ($p<0,05$), порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили. У групі тварин, яким проводили корекцію з використанням МСК показник АПІ на 1-шу добу зріс на 15,2 % ($p<0,05$), 7-му – на 30,6 % ($p<0,05$), 14-ту – на 15,8 %, 21-шу – на 18,2 % порівняно з травмованими тваринами, яким корекцію не проводили.

2. Посттравматичний період характеризується інтенсивним зростанням протеолітичної активності крові на тлі менш виразного зростання антипротеазної активності (лізис азоальбуміну на першу добу зростав у 7,6 рази ($p<0,001$), показник лізису азоказеїну – у 10,3 ($p<0,001$), лізис азоколу – у 7,7 рази ($p<0,001$), концентрація α_2 -МГ, зросла у 2,1 рази ($p<0,01$), α_1 -ІІ – в 1,8 рази ($p<0,05$) порівняно з тваринами без змодельованої патології на 1-шу добу експерименту. Менш виразне зростання інгібіторного потенціалу, поряд із суттєвим зростанням протеолітичної активності, відобразилося на значенні індексу протеолізу – зростання у 4,2 рази ($p<0,001$). Застосування плазми, збагаченої тромбоцитами, зменшує дисбаланс системи протеази/антипротеази, що супроводжується зниженням індексу протеолізу особливо у більш пізні терміни після нанесення травми.

3. При травматичному ушкодженні м'язів спостерігається зростання на 1-шу добу концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 β у 2,4 рази ($p < 0,05$), TNF- α -у 2,6 рази ($p < 0,05$), порівняно з тваринами, яким моделювання травми не проводилось), з подальшим зниженням до 21-ої доби. Концентрація протизапального IL-10 вірогідно зростала на 1-шу добу в 1,6 рази ($p < 0,05$), тоді як на 7-му добу зменшувалась, статистично значимо не відрізняючись від показників інтактної групи.

Застосування плазми крові, збагаченої тромбоцитами, супроводжувалось зменшенням концентрації прозапальних цитокінів сироватки крові. Так, концентрація IL1- β на 1-шу добу була меншою на 29,3 %, концентрація TNF- α – на 21,0 %, IL6 –на 29,6 % від показників тварин з травмою м'язів без корекції. Від 14-ої доби після застосування PRP концентрація прозапальних цитокінів практично не відрізнялася від даних тварин без змодельованої патології.

4. Механічна травма м'язів супроводжується достовірним зростанням МСМ уже через 24 год від моменту нанесення травми. Так, вміст МСМ1 зріс у 2,3 рази ($p < 0,05$), МСМ2 – у 2,8 рази ($p < 0,05$) відносно інтактних тварин. Інтоксикаційний синдром, спричинений травмою, спричиняє підвищений розпад тканин, посилення катаболічних процесів, внаслідок накопичення надлишкової кількості біологічно активних речовин, на що вказують виражені зміни еритроцитарного та лейкоцитарного індексів інтоксикації. Застосування коригуючих чинників супроводжувалось зниженням ступеня ендогенної інтоксикації та зменшенням впливу токсичних продуктів на мембранні структури.

5. В результаті оцінки впливу збагаченої тромбоцитами плазми крові на регенеративні процеси в м'язовій тканині *in vitro* встановлено, що плазма збагачена тромбоцитами у вигляді 5 % добавки до ростового середовища має виражену стимулюючу дію на проліферативну активність фібробластів, але менш ефективна у випадку клітинної культури мезенхімальних стовбурових клітин. Міогенні клітини щурів володіють високим проліферативним потенціалом і не потребують додаткової стимуляції збагаченою тромбоцитами плазмою крові у дослідженій нами концентрації.

6. Гістологічними і морфометричними дослідженнями встановлено, що при травматичному ушкодженні м'язів у експериментальних тварин структурні зміни в м'язовій тканині починають розвиватись уже з 1-ої доби експерименту упродовж усього періоду досліджень і проявляються вираженими розладами кровообігу та розвитком дистрофічно-некротичних змін, особливо в епітеліальних структурах, досягаючи максимуму на сьому добу. Застосування PRP супроводжувалось достовірним збільшенням кількості неушкоджених волокон та зменшенням кількості ушкоджених волокон уже з 7-ої доби після ушкодження, зростанням регенераторної активності м'язових волокон. Застосування МСК також сприяє збільшенню кількості неушкоджених волокон та зростанню регенераторної активності, проте у меншій мірі, ніж PRP.

7. Патоморфологічне дослідження легень, нирок та печінки на тлі травматичного ушкодження м'язів нижніх кінцівок та за умов корекції збагаченою тромбоцитами плазмою крові та стовбуровими клітинами показало, що на 1-шу добу експерименту у досліджуваних органах розвиваються дистрофічні зміни в усіх епітеліальних компонентах, проте найбільш вираженими вони є в печінці та легенях. В легенях наростали розлади кровообігу у поєднанні із помірною лімфо-плазмоцитарною інфільтрацією стромы до 14-ої доби і дещо зменшувались до 21-ої доби. В печінці порушувалась часточкова структура, наростали виражені дистрофічні зміни переважно до 14-ої доби і дещо зменшувались прояви до 21-ої доби. В нирках наростали розлади кровообігу як в кірковому так і в мозковому шарі, виникали дистрофічні зміни епітелію вивідних каналців.

Застосування PRP та МСК має в різній мірі протекторний ефект уже із 1-ої доби застосування. Застосування PRP проявляє переважно місцевий вплив, покращуючи відновлення структур в ділянці рани та має поверхневий вплив на відновлення епітеліального компоненту паренхіматозних органах, переважно у віддалені періоди. Застосування МСК проявляє більш загальний протекторний вплив на структуру пошкоджених переважно епітеліальних структур паренхіматозних органів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аналіз, прогнозування та профілактика травматизму з важкими наслідками / Р. І. Пахомов, Г. М. Гасій, І. О. Білоус, Т. В. Лаврут. *Збірник наукових праць Харківського університету Повітряних Сил*. 2015. Вип. 2 (43). С. 139–144.
2. Андрейчин С.М., Голомша Т. О. Сучасні уявлення про метаболічну ендогенну інтоксикацію. *Інфекційні хвороби*. 2012. № 1. С. 84–87.
3. Антиоксидантное и антиагрегационное действие ковалентного биферментного конъюгата супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза на тромбоциты. / А. В. Ваваев и др. *Биомедицинская химия*. 2012. Т. 58, вып. 3. С. 300-309
4. Антиоксидантно-прооксидантний індекс сироватки крові щурів з експериментальним стоматитом і його корекція зубними еліксирами / А. П. Левицький, В. М. Почтар, О.А. Макаренко, Л. І. Гридінна.. 2006. № 1. С.22–25
5. Атаман В. О. Патолофізіологія. Том 2. Патолофізіологія органів і систем. Вінниця: ПП «Нова Книга». 2017. С. 89–91.
6. Ахмеров Р., Зарудий Р., Рычкова И. Плазмолифтинг – лечение возрастной атрофии кожи, богатой тромбоцитами аутоплазмой. *Эстетическая медицина*. 2011. № 10 (2). С. 3–9.
7. Бакалюк О.Й., Панчишин Н.Я., Дзига С.В. Синдром ендогенної інтоксикації, механізм виникнення, методи ідентифікації. *Вісник наукових досліджень*. 2000. № 1. С. 11–13.
8. Бермон Стефан. http://irbis.sstu.ru/cgi-bin/irbis64r_13/cgiirbis_64.exe?LNG=uk&Z21ID=&I21DBN=MARS&P21DBN=MARS&S21STN=1&S21REF=1&S21FMT=fullwebr&C21COM=S&S21CNR=30&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=M=&S21STR= Плазма, обогашенная тромбоцитами – возможен ли терапевтический успех в легкой атлетике? *Легкая атлетика*. 2012. № 5/6. С. 8-10

9. Богдан В. Г., http://irbis.sstu.ru/cgi-bin/irbis64r_13/cgiirbis_64.exe?LNG=uk&Z21ID=&I21DBN=MARS&P21DBN=MARS&S21STN=1&S21REF=1&S21FMT=fullwebr&C21COM=S&S21CNR=30&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=M=&S21STR= Толстов Д. А. Проспективное рандомизированное клиническое исследование эффективности применения аутологичных тромбоцитарных концентратов для стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии. *Новости хирургии*. 2014. Т. 22, № 3. С. 344-350
10. Булякова Н. В. Азарова В. С. Эффективность лазерного воздействия на регенерацию скелетных мышц при различной интенсивности механического повреждения (экспериментальное исследование). *Физиотерапия, бальнеология и реабилитация*. 2013. № 6. С. 4-9
11. Вариабельность ответа тромбоцитов на АДФ: от теории тромбогенеза к практическому применению богатой тромбоцитами плазмы. / В. С. Горохова и др. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016. Т. 61, № 6. С. 363-367
12. Веремеенко К. Н. Протеолиз в норме и при патологии. К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. К. Здоров'я, 1988. 200 с.
13. Влияние локальной терапии аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой на болевой синдром у больных остеоартрозом коленных суставов. / Л. Ю. Широкова и др. *Клиническая медицина*. 2012. Т. 90, № 10. С. 48-52
14. Влияние нанокompозитов фуллерена C[60] на агрегацию тромбоцитов человека. / В. И. Ващенко и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011. Т. 152, № 11. С. 557-559
15. Влияние скорости ускорения и времени на обогащение плазмы тромбоцитами. / В.А. Фищенко, М.В. Рыбинский, А.В. Фищенко. Н.Ю. Нимчик *Вісник ортопедії, травматології та протезування*. 2017. №3. С.31-35
16. Волотовська Н.В., Гудима А.А. Особливості реакції пероксидного окиснення ліпідів, антиоксидантного захисту, ендогенної інтоксикації та

цитолізу під впливом травми різного ступеня тяжкості. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2012. №1. С.29-33

17. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на проліферативну активність клітинних культур. / В.Г., Дживак, А.І. Довгалюк, І.Р. Палій, І.М. Кліщ *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*: матеріали підсумкової LXIII науково-практичної конференції, 12 червня 2020 року. Тернопіль, Укрмедкнига. С.58.

18. Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів. / Д.С. Корольова, В.О. Чернишенко, О.В. Горницька, Т.М. Платонова. *Укр. біохім. журн.* 2009. Т. 81, № 5. – С. 58-65.

19. Вплив різної концентрації тромбоцитів у плазмі крові на хондрогенез клітин пульпозного ядра щурів *in vitro*. / Є. Г. Педаченко та ін. *Журнал Національної академії медичних наук України : науковий журнал Президії НАМН України*. 2018. Том 24, № 3/4. С. 232-238. ISSN 2413-7944

20. Гайович В.В. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми на відновлення нерва і м'яза після їх травматичного ушкодження. *Український нейрохірургічний журнал*. 2014. №3. С.79-83.

21. Гайович В.В., Макаренко О.М., Савосько С.І. Порівняльний аналіз змін скелетних м'язів гомілки щура при травматичному ушкодженні сідничного нерва різної локалізації. *Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»* 2013. №13, вип. 4(44). С.77-81

22. Геращенко С.Б., Дельцова О.І., Чайковський Ю.Б. Стівбурові клітини посмугованої м'язової тканини. *Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина», випуск 1 (46), 2013 р.* С.188-191

23. Горбатенко А.И., Костяная Н.О. Применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы в комплексной терапии остеоартроза коленных суставов. *Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова*. 2016. №2. С. 40-45.

24. Гудима А.А., Кацак Т.В., Шепітько К.В. Антиоксидантно-прооксидантний та цитокиновий баланс у пізній період комбінованої травми в

експерименті. *Світ медицини та біології*. 2019. №1(67), С.42-47. 2012. Т. 58, вып. 3. С. 300-309. doi 10.26724/2079-8334-2019-1-67-42

25. Гур'єв С. О., Танасієнко П. В., Сацик С. П. Клініко-епідеміологічна характеристика постраждалих з інфекційними ускладненнями політравми внаслідок ДТП. *Медицина сьогодні і завтра*. 2012. № 1. С. 54

26. Гур'єв, С. О., Танасієнко, П. В., Ковалишин, І. В. Віково-статева характеристика постраждалих з інфекційними ускладненнями політравми в результаті ДТП. *Травма*. 2019. 20(1). С.47-51. doi: <http://dx.doi.org/10.22141/1608-1706.1.20.2019.158667>

27. Дедуль М. И., Радецкая Л. Е., Кирпиченок Л. Н. Система протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости при хирургическом лечении больных эндометриозом. *Новости хирургии*. 2006. Т. 14, № 3. С. 74–80.

28. Дейкало В. П., http://irbis.sstu.ru/cgi-bin/irbis64r_13/cgiirbis_64.exe?LNG=uk&Z21ID=&I21DBN=MARS&P21DBN=MARS&S21STN=1&S21REF=1&S21FMT=fullwebr&C21COM=S&S21CNR=30&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=M=&S21STR= Мастыков А. Н., Боллобошко К. Б. Обогащенная тромбоцитами плазма в лечении заболеваний и повреждений опорно-двигательного аппарата. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2011. Т. 10, № 4. С. 6-12

29. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на стан системи протеїнази/інгібітори протеїназ при травматичному ураженні м'язів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. №3. С. 72-80. DOI 10.11603/1811-2471.2020.v.i3.11585

30. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Динаміка показників протеїназо/інгібіторної системи крові при травматичному ураженні м'язів в експерименті. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм: матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології 110-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О. Галицькі читання II, 29-30 жовтня 2020 р.. м. Тернопіль*. 2020. С. 40-41.

31. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Ефективність збагаченої тромбоцитами плазми крові в індукції загоєння м'язової тканини в експериментальному дослідженні. *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*. 2020. №3 (91). С. 36-43. DOI: <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2020.3.11461>

32. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Особливості цитокинового профілю у сироватці крові щурів за умови корекції травми м'язів збагаченою тромбоцитами плазмою крові. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2020. №3. С. 53 -58. DOI: <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2020.3.11518>

33. Дживак В. Особливості морфологічних змін у легенях, нирці, печінці у посттравматичному періоді травматичного ураження м'язів стегна в експерименті. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020. Тернопіль, 2020. С. 211.

34. Дживак В. Рівень активності ред-окс системи у різних групах щурів з травматичним ушкодженням м'язів в експерименті під впливом збагаченої тромбоцитами плазми крові. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020. Тернопіль, 2020. С. 211-212.

35. Дживак В.Г. Особливості методики отримання плазми, збагаченої тромбоцитами *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю*, 23-24 вересня 2020 року. Тернопіль, Укрмедкнига. 2020. С. 278-279.

36. Дживак В.Г., Кліщ І.М. Антиоксидантна система захисту при експериментальній травмі м'язів. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXII науково-практичної конференції присвяченої 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського*, 13 червня 2019 року. Тернопіль, 2019. С.84

37. Дживак В.Г., Кліщ І.М. Травматичне ураження м'язової тканини та роль збагаченої тромбоцитами плазми. *Здобутки клінічної та*

експериментальної медицини: матеріали підсумкової LXI науково-практичної конференції, 7 червня 2018 року. Тернопіль, 2018. С.223-224

38. Дивоча В.А., Дерібон Е.Л. Роль інгібиторов протеїназ в патогенезі захворювань людини (обзор літератури і власних досліджень, частина 1). *Актуальні проблеми транспортної медицини*. 2013. Т. 1, № 2 (32). С. 127–137.

39. Доленко Фелікс. Причини, умови і механізм типової травми м'язів задньої поверхності бедра у спринтерів. *Легка атлетика*. 2016. № 7/8. С. 11-12

40. Ефективність збагаченої тромбоцитами плазми при обмежених пошкодженнях хряща: огляд базових і клінічних досліджень. / В.О. Фіщенко та ін. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*. 2016. Випуск 3 С.63-69

41. Збагачена тромбоцитами плазма в комплексі післяопераційного лікування суглобового синдрому. / В.О. Фіщенко та ін. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*. 2017. Том1. Випуск 92. С. 40-45

Збірник наукових праць Харківського університету Повітряних Сил. 2015. Вип. 2 (43). С. 139–144

42. Інтенсивна терапія політравми з позицій сучасних міжнародних рекомендацій. / Ю. Ю. Кобеляцький і др. *Медицина неотложних станів*. 2013. № 7. С. 9–14.

43. Йоргенсен У. Роль правил і судейства в профілактиці травм / У. Йоргенсен // Спортивні травми. Основні принципи профілактики і лікування. Київ : Олимп. лит, 2002. – С. 184–189.

44. Івченко Д. В., Мірошніков В. В. Застосування аутологічної плазми, що збагачена тромбоцитами, для оптимізації репаративної регенерації кісткової тканини при остеопенії. *Патологія*. 2018. № 2 (43). С. 248–258

45. Карягіна І. Ю., Зарембський Р. А., Балябіна М. Д. Використання методу комплексного визначення активності трипсиноподібних протеїназ, $\alpha 1$ -антитрипсина і $\alpha 2$ -макроглобуліна в гастроентерологічній клініці. *Лабораторне дело*. 1990. № 2. С.10–13.

46. Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы). *Клинич. лаб. диагностика*. 2004. № 3. С. 4–8.

47. Клітинні технології в комплексі лікування розладів аутистичного спектра. / Т.І. Петрів, М.М. Татарчук, Ю. В. Цимбалюк, В. І. Цимбалюк *Міжнародний неврологічний журнал*. 2020. № 6 (16). С. 18-25.

48. Клітинні технології у відновленні периферичних нервів. / Т. І. Петрів та ін. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2020. № 8(2). 210-229. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2020;8\(2\):210-229](https://doi.org/10.21272/eumj.2020;8(2):210-229)

49. Ковпак В. В., Ковпак О. С. Порівняння різних методів виділення стовбурових клітин з підшлункової залози щура. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2018. № 2. С. 132-135.

50. Кожемякін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін. – К., 2002. –155 с.

51. Кресюн В. Й., Семенців Н. Г., Регеда М. С. Особливості зрушень стану протеїназо-інгібіторної системи за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту і шляхи його корекції. *Одеський медичний журнал*. 2009. № 3 (113). С. 35–37.

52. Криницька І. Я. Стан протеїназо-інгібіторної системи крові та бронхоальвеолярного змиву у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом. *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. 2012. Т. 7, № 4. С. 92–97.

53. Кузняк Н. Б . Продан М. П., Трифаненко С. І. Ефективність застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові для оптимізації репараційного остеогенезу після атипичного видаленні зубів. *Клініч. та експерим. патологія: укр. наук.-практ. журн*. 2013. Т. 12, N 2. С. 103-105

54. Липова Е. В. Покровский К. А., Просянникова Н. В. Аутологичная тромбоцитами плазма в лечении эрозивно– язвенных поражений кожи *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. 2013. №4. С. 48–52.

55. Марущак М. И. Система фактора некроза опухолей альфа в патогенезе экспериментального острого поражения легких. *Туберкулез, легочные болезни, ВИЧ-инфекция*. 2012. № 2. С. 27–31.
56. Марущак М. І. Закономірності змін цитокинового статусу в бронхоальвеолярному змиві щурів за умови гострого ураження легень. *Шпитальна хірургія*. 2012. № 2. С. 39–42.
57. Метод определения активности каталазы. / М. А. Королюк и др. *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16–19.
58. Методики морфологічних досліджень: монографія/ Багрій М.М., Діброва В.А., Попадинець О.Г., Грищук І.М., за ред. М.М. Багрія, В.А. Діброви. – Вінниця: Нова книга, 2016. 238 с.
59. Механічні м'язові травми: діагностування і терапія. / Т.Ю. Матвієнко та ін. *Фізіол. журн*. 2019. Т. 65, № 5. С. 77-89. ISSN 0201-8489
60. Мининкова А. И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012. № 3. С. 27-34.
61. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания. / М. С. Макаров и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 156, № 9. С. 388-391
62. Морфофункціональні зміни в легенях та печінці у ранній період після травматичного ураження м'язів в експерименті. / В. Г. Дживак, І. М. Кліщ, Т. В. Дацко, О. І. Хлібовська *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. №1. С. 74-77. DOI 10.11603/1811-2471.2020.v.i1.11072
63. Ніканоров О. К. Проблема травматизму в ігрових видах спорту та перспективи використання засобів фізичної реабілітації. *Спортивна медицина*. 2015. № 1–2. С. 82-86
64. Подунай Ю. А., Залевская И. Н., Руднева И. И. Возрастная динамика активности катепсинов и содержания среднемoleкулярных пептидов в мышцах морского ерша. *Ученые записки Таврического национального*

университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2009. Т. 22 (61), № 4. С. 128–134.

65. Поляева Т. О., Утц С. Р. Применение обогащенной тромбоцитами плазмы в дерматокосметологии (обзор). *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2016. Т. 12, № 3, Прил. 2 : Дерматовенерология. С. 518-520

66. Попередня макроскопічна оцінка репаративного хондрогенезу під впливом збагаченої тромбоцитами плазми в експериментальній моделі / В.О. Фіщенко, М.В. Рибінський, О.В. Фіщенко, Б.Б. Леськів. *Вісник морфології*. 2017.23, № 1. С. 19-23.

67. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования. / Семенова В.М. и др. *Укр. нейрохірург. журнал*. 2014. №3. С. 24-9. doi: 10.25305/unj.47487.

68. Порівняльний аналіз лікування тендинопатій привідних м'язів стегна у спортсменів на ранніх стадіях захворювання. / О. О. Коструб та ін. *Вісн. ортопедії, травматології та протезування: Український науково-практичний журнал*. 2015. №1. С. 16-21

69. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике. / Е. Е. Ачкасов, Э. Н.Безуглов, А. А.Ульянов, В. В. Куршев *Биомедицина*. 2013. № 4. С. 46-59.

70. Ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. / В.І. Цимбалюк та ін. *Травма*. 2018. №2 (19). С.5-12.

71. Регенерация кости при использовании аутогенной костной ткани и фибрина, обогащенного тромбоцитами. / О.А. Бурьянов, Т.Н. Омельченко, Ю.А. Ярмолук, М.В. Вакулич. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1(135). С. 96–99.

72. Рибалка Я. В. Застосування PRP-терапії в комплексі передопераційної підготовки до аутодермопластики при лікуванні хронічних

ран. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2018. Т. 18, вип. 1 (61). С. 117–120.

73. Смертність населення України у трудоактивному віці (монографія) / Відпов. ред. Е. М. Лібанова. – К. Ін-т демографії та соціальних досліджень НАН України, 2007. – 211 с.

74. Семёнова В.М. Аспекты применения метода культивирования тканей в нейробиологии и нейроонкологии. Киев: Интерсервис; 2018.

75. Состояние оказания помощи пострадавшим с политравмой / В. Г. Рынденко и др. *Сборник научных трудов ХГКБСНП*. Харьков: Основа, 2000. Вып. 3. С. 40–43.

76. Сперанский И.И., Самойленко Г.Е., Лобачева М.В. Общий анализ крови – все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения. *Здоровье Украины*. 2009. № 6 (19). С.51-57.

77. Способ диагностики эндогенной интоксикации / А.А. Тогайбаев и др. *Лабораторное дело*. 1988. №9. С.22–24.

78. Сравнительный эффект обогащенной тромбоцитами плазмы, лизата тромбоцитов и эмбриональной телячьей сыворотки на мезенхимные стволовые клетки. / А. П. Лыков и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 163, № 6. С. 722-725

79. Стальная И. Д. Метод определения диеновых конъюгат высших жирных кислот // *Современные методы в биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича. – М: Медицина, 1977. – С. 63–64.

80. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*. М: Медицина, 1997. – С. 66-68.

81. Стан системи протеїнази/інгібітори протеїназ у щурів у динаміці іммобілізаційного стресу на тлі гіпотиреозу./ О. Є. Любович, І. М. Кліщ,

А. С. Вольська, Х. І. Курилою. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 3. С. 110–118.

82. Структурная характеристика тромбоцитов и тромбоцитарных микровезикул. / А. А. Пономарева и др. *Цитология*. 2016. Т. 58, № 2. С. 105-114.

83. Универсальный регулятор – α_2 -макроглобулин / Н. А. Зорин, В. Н. Зорина, Р. М. Зорина, В. Г. Левченко. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004. № 11. С. 18–21.

84. Фенотипическая характеристика и пролиферативный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из Вартонова студня пуповины человека в условиях культивирования. / В. И. Цымбалюк и др. *Аспекты применения метода культивирования тканей в нейробиологии и нейроонкологии*. Киев: Интерсервис, 2018. С. 295-304.

85. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале. *Лабораторное дело*. 1985. № 11. С. 678–681

86. Чернышев В. В. Богатая тромбоцитами плазма в хирургической практике. *Стоматолог*. 2008. №9. С. 36-39
http://library.zsmu.edu.ua/cgi/irbis64r_14/cgiirbis_64.exe?LNG=&Z21ID=&I21DBN=ZSMUL&P21DBN=ZSMUL&S21STN=1&S21REF=1&S21FMT=fullwebr&C21COM=S&S21CNR=20&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=M=&S21STR=

87. Чорноморець П. М., Нурищенко Н. Є. Запалення при м'язовій травмі: пошкоджуюча та відновлювальна дія. *Фізика живого*. 2008. Т. 16 (1). С. 171–174.

88. Широбокова, Д. А. Сравнительная эффективность методов получения плазмы, обогащенной тромбоцитами. *Вестник ветеринарии*. 2014. № 1 (68). С. 44-46

89. Экспериментально-морфологическое и клиническое обоснование применения аутотромбоцитарных факторов роста в комплексном лечении

разрывов ахиллова сухожилия. / Г. А. Кесян и др. *Вестник травматологии и ортопедии имени Н. Н. Приорова*. 2012. № 4. С. 32-37

90. Эффективность применения обогащенной тромбоцитами плазмы при лечении травматических дефектов хряща суставных поверхностей. / А. Н. Мастыков и др. *Новости хирургии*. 2013. Т. 21, № 4. С. 3-9

91. 3D Printing of Composite Calcium Phosphate and Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *Biomaterials*. / J.A. Inzana et al. 2014.35 (13). P. 4026–4034.

92. A Histoarchitectural Approach to Skeletal Muscle Injury: Searching for a Common Nomenclature / B. Ramon et al. *The Orthopaedic Journal of Sports Med*. 2020 Mar; 8(3): doi: [10.1177/2325967120909090](https://doi.org/10.1177/2325967120909090)

93. A long-gap peripheral nerve injury therapy using human skeletal muscle derived stem cells (Sk-SCs): An achievement of significant morphological, numerical and functional recovery / T. Tamaki et al. *PLoS One*. 2016. Vol. 11(11): e0166639. PubMed PMID: 27846318; PubMed Central PMCID: PMC5112878. doi: [10.1371/journal.pone.0166639](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166639).

94. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology / Crisco J.J. et al. *Am J Sports Med*. 1994. Vol. 22(5). P. 702-10.

95. A Review of metaboc staging in severely injured patients. / M. Aller, J. Arias, A. Alonso-poza J. Arias. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med*. 2010. Vol. 18, № 27. DOI: [10.1186/1757-7241-18-27](https://doi.org/10.1186/1757-7241-18-27).

96. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. / D. Burzyn et al. *Cell*. 2013. Vol. 155(6). P. 1282–1295. doi: [10.1016/j.cell.2013.10.054](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054)

97. A standardized research protocol for platelet rich plasma (PRP) preparation in rats. / M.R. Messori et al. *RSBO*. 2011. Vol. 8 (3). P. 299–304.

98. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division / P. Rocheteau et al. *Cell*. 2012. Vol. 148, 1-2. P. 112-25. doi:[10.1016/j.cell.2011.11.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.049)

99. A Wnt-TGF β 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. / S. Biressi et al. *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6(267) doi: 10.1126/scitranslmed.3008411.
100. Abdallah B. M., Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008. Vol. 15. P. 109–116
101. Abedin M.Z., Riemschneider R. Collagen heterogeneity and its functional significance. *Die Ang Makromol Chem.* 1983. Vol. 111 (1). P. 107–122.
102. Abrahamsson S.O., Lundborg G., Lohmander L.S. Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res.* 1991. Vol. 9. P. 495–502.
103. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system / M. Ikeda et al. *J Biomed Mater Res A.* 2014. Vol. 102(5). P. 1370-8.
104. ACL injury reduces satellite cell abundance and promotes fibrogenic cell expansion within skeletal muscle. / C. S. Fry et al. *J. Orthop. Res.* 2017. Vol. 35. P. 1876–1885. doi: 10.1002/jor.23502
105. Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon. / M. Rickert et al. *Connect Tissue Res.* 2005. Vol. 46. P. 175–183.
106. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. / D. Smrke et al. *Eur Surg Res.* 2007. Vol. 39 (3). P. 170–174.
107. Almekinders L.C. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Sports Med.* 1999 Dec;28(6):383-8.
108. Altered interleukin-10 signaling in skeletal muscle regulates obesity-mediated inflammation and insulin resistance. / S. Dagdeviren et al. *Mol. Cell. Biol.* 2016. Vol. 36, P. 2956–2966. doi: 10.1128/MCB.00181-116
109. AMPK activation regulates LTBP4-dependent TGF- β 1 secretion by pro-inflammatory macrophages and controls fibrosis in duchenne muscular dystrophy. /

G. Juban et al. *Cell Rep.* 2018. Vol. 25. P. 2163–2176. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.077

110. Andia I., Abate M. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(7):987-999. doi:10.1517/14712598.2015.1038234

111. Anitua E, Prado, Sánchez M, Orive G. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Operative Techniques in Orthopaedics.* 2012. Vol. 22(1) P. 25–32.

112. Application of platelet-enriched autoplasm in clinical practice./ E.E. Achkasov et al. *Biomedicine.* 2013. № 4. P. 46-59.

113. Aspenberg P., Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004. Vol. 75 (1). P. 93–99

114. Beredjikian P.K. Biologic aspects of flexor tendon laceration and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003. Vol. 85(3). P. 539-50.

115. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms./ W. Geremicca et al. *Blood Transfus.* 2010. Vol. 8, № 2. P. 107-112.

116. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. / A Mishra. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2009. Vol. 15, No 3. P. 431–435.

117. Cell and Biologic-Based Treatment of Flexor Tendon Injuries Stephen / W. Linderman et all. *Oper Tech Orthop.* 2016. Vol. 26(3). P. 206–215. doi: 10.1053/j.oto.2016.06.011

118. Changes in serum cytokines in response to musculoskeletal surgical trauma. / O. Reikeras, et al. *BMC Res. Notes.* 2014. Vol. 7 (128).

119. Chen, S. E., Jin, B., Li, Y.P. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am. J. Physiol. Physiol.* 2007. Vol. 292. P. 1660–1671. doi: 10.1152/ajpcell.00486.2006

120. Cho J.W., Kim S.A., Lee K.S. Platelet-rich plasma induces increased expression of G1 cell cycle regulators, type I collagen, and matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2012. Vol. 29. P. 32–36.

121. Chrysou K. Lessons from a large trauma center: impact of blunt chest trauma in polytrauma patients – still a relevant problem? *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. – 2017. – Vol. 25, No. 1. – P. 42.
122. Cohen S. Origins of growth factors: NGF and EGF. *J Biol Chem*. 2008. Vol. 283(49) P. 33793-33797.
123. Cole B.J., Seroyer S.T., Filardo G. Platelet-rich plasma: where are we now and where are we going? *Sports Health*. 2010. Vol. 2. No 3. P. 203–210.
124. Combined use of platelet rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects. / Zeynep Yassibag-Berkman et al. *J Periodontol*. 2007. Vol. 78 (5). P. 801–809.
125. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet rich plasma separation systems. / T.N. Castillo et al. *Am J Sports Med*. 2010. Vol. 39. P. 266 –271.
126. Complications following young femoral neck fractures. / G.P. Slobogean et al. *Injury*. 2015. Vol. 46 (3). P. 484–491.
127. Complications of hip fractures: A review. / P. Carpintero et al. *World J Orthop*. 2014. Vol. 5 (4). P. 402–411.
128. Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. / O. Contreras et al. *Cell Tissue Res*. 2016. Vol. 364. P. 647–660. doi: 10.1007/s00441-015-2343-0
129. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor β 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle / H. Li et al. *Biomaterials*. 2016. Vol. 87. P. 147–156.
130. Dahlgren L.A., Mohammed H.O., Nixon A.J. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions. *J Orthop Res*. 2006. Vol. 24. P. 183–192.
131. David M Dohan Ehrenfest, Lars Rasmusson, Tomas Albrektsson. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to

leucocyte- and platelet-rich fibrin (LPRF). *Trends in Biotechnology*. 2009. Vol. 27(3). P. 158-67.

132. DeLong J.M., Russell R.P., Mazzocca A.D.. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012. Vol. 28(7). P. 998-1009. doi:10.1016/j.arthro.2012.04.148

133. Demetris D., Travis G. Maak, Scott A. Rodeo. Muscle Injuries in Athletes. Enhancing recovery through scientific understanding and novel therapies. *Sports Health*. 2013 Jul; 5(4): 346-52.

134. Developing a pro-regenerative biomaterial scaffold microenvironment requires T helper 2 cells./ Kaitlyn Sadtler et al. *Science (New York, N.Y.)*. 2016. Vol 352, 6283 P. 366-70. doi:10.1126/ science. aad 9272

135. Diagnosis-dependent relationships between cytokine levels and survival in patients admitted for surgical critical care / T. Hranjec et al. *J. Am. Coll. Surg.* 2010. Vol. 210. P. 833–844.

136. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 2010. Vol. 276. P. 33–79.

137. Distribution of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly in the central nervous systems of the EAE rats. / M. V. Kovalchuk et al. *Biopolymers and Cell*. 2015. Vol. 31, № 5. P. 371-378. URL: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008F9> doi: 10.1177/0363546517750635.

138. Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy / B. Malecova et al. *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. P. 3670. doi: 10.1038/s41467-018-06068-6

139. Dzhyvak V. G., Dovhalyuk A. I., Paliy I. R., Klishch, I. M. Research of stimulating efficiency of blood allogeneic plasma fractions on cell proliferation in vitro conditions. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020.10(8). P. 559-569. eISSN 2391-8306. DOI: <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.08.068>

140. Dzhyvak V. The level of tba – active products under the conditions of traumatic muscle damage. *Матеріали XXIII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 15-17 квітня 2019. Тернопіль, 2019. С. 308-309.

141. Dzhyvak V.H., Khibovska O.I., Klishch I.M. Role of endogenic intoxication in muscle injury in experiment. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2019. Volume 5, Issue 2. P. 122-127. DOI 10.11603/IJMMR.2413-6077. 2019.2.10310

142. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7 members of the TGF-beta gene family. / Wolfman N.M. et al. *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. P. 321–330.

143. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. / Weibrich G. et al. *Bone*. 2004. Vol. 34. P. 665-671.

144. Effect of platelet lysate on chondrogenic differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in vitro / X. Feng et al. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2011. Vol. 25 No 10. P. 1250–1255.

145. Effect of recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) on fibroblast-like cells from human rotator cuff tendon. / S. Takahasih et al. *Tohoku J Exp Med*. 2002. Vol. 198. P. 207–214.

146. Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro. / S. Thomopoulos et al. *J Hand Surg. Am.* 2005. Vol. 30(3). P. 441– 447.

147. Effect of TGF-beta inducible early gene deficiency on flexor tendon healing. / T. Tsubone et al. *J Orthop Res*. 2006. Vol. 24. P. 569 –575.

148. Effects of administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 and anti-TGF-beta1 antibody on the mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. / T. Katsura et al. *J Biomech*. 2006. Vol. 39. P. 2566 –2572.

149. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. / B.P. Chan et al. *Acta Orthop Scand*. 2000. Vol. 71. P. 513–518.

150. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. / K. Kashiwagi et al. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2004. Vol. 38. P. 193–197.

151. Engineering Flexor Tendon Repair With Lubricant, Cells, and Cytokines in a Canine Model. / C. Zhao et al. *Clin Orthop Relat Res*. 2014. Vol. 472(9). 2569–2578.

152. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg 1986. No. 123– 52 p.

153. Evaluation of autologous skeletal muscle-derived factors for regenerative medicine applications / M. Yoshikawa et al. *Bone Joint Res*. 2017. Vol. 6(5). P. 277-83. doi: 10.1302/2046-3758.65.BJR-2016– 0187.R1.

154. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. / M. Relf et al. *Cancer Res*. 1997. Vol. 57(5). P. 963-9.

155. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in patellar tendon grafts in the early phase after anterior cruciate ligament reconstruction. / T. Yoshikawa et al. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2006. Vol. 14. P. 804–810.

156. Fernandes T.L., Pedrinelli A., Hernandez A.J. Muscle injury – physiopathology, diagnosis, treatment and clinical presentation. *Rev Bras Ortop*. 2011. Vol. 46(3). P. 247-55.

157. Fibro-Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. / Biferali Beatrice et al. *Frontiers in physiology*. 2019. Vol. 10 P. 1074. doi:10.3389/fphys.2019.01074

158. Flynn J.E., Graham J.H. Healing of tendon wounds. *Am J Surg*. 1965. Vol. 109. P. 315–324.

159. Furlow L.T. Jr. The role of tendon tissues in tendon healing. *Plast Reconstr Surg.* 1976. Vol. 57. P. 39–49.
160. Gaiko G.V., Derkach R.V. Cause analysis and study of the causes of influenza mortality rate in car accidents with injuries to the musculoskeletal system. *Science and practice.* 2014. Vol. 1. P. 82-6.
161. Gerber C., Strehle J., Ganz R. The treatment of fractures of the femoral neck. *Clin Orthop Relat Res.* 1993. Vol. 292. P. 77–86.
162. Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity / Y. Dong et al. *FASEB J.* 2014. Vol. 28, P. 4123–4132. doi: 10.1096/fj.14-254011
163. Goodship A.E., Birch H.L., Wilson A.M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *The Veterinary Clinics of North America. Vet Clin North Am Equine Pract.* 1994. Vol. 10. P. 323–349.
164. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by cellular composition of platelet-rich plasma / E.A. Sundman et al. *Am J Sport Med.* 2011. № 39. P. 2135-2140. Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction. / L. Bissell et al. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2014. Vol. 10, № 1. P. 19-25.
165. Guide for the care and use of laboratory animals. – 8th ed. – Washington: The National Academies Press, 2011. – 246 p.
166. Hallen A., Ekstrand J. Return to play following muscle injuries in professional footballers. *J Sports Sci.* 2014. Vol. 32(13). P. 1229-36.
167. Hannink M., Donoghue D.J. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 989 (1). P. 1–10. PMID 2546599.
168. HGF potentiates extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: involvement of matrix metalloproteinases and MAPK/ERK pathway. / M. N. González et al. *Skelet. Muscle.* 2017. Vol. 7. P. 20. doi: 10.1186/s13395-017-0138-6

169. High-dimensional single-cell cartography reveals novel skeletal muscle-resident cell populations. / L. Giordani et al. *Mol. Cell*. 2019. Vol. 74. P. 609–621. doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.026
170. Hip fractures in adults younger than 50 years of age. Epidemiology and results. / C.M. Robinson et al. *Clin Orthop Relat Res*. 1995. Vol. 312. P. 238–246.
171. Histologic Evidence of New Collagen Formulation Using Platelet Rich Plasma in Skin Rejuvenation: A Prospective Controlled Clinical Study. / Ozlem Karabudak Abuaf et. al. *Ann Dermatol*. 2016. Vol. 28(6). P. 718-724. <https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.6.718>
172. Huang G.T., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009. Vol. 88(9). P. 792-806. doi: 10.1177/0022034509340867.
173. Huard J., Li Y., Fu F.H. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Jt Surg Am*. 2002. Vol. 84. P. 822-832.
174. Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum / J.I. Heger et al. *Exp Cell Res*. 2018. Vol. 365(1). P. 57-65. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.017.
175. Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. / I. Giusti et al. *Transfusion*. 2009. Vol. 49. P. 771-778.
176. IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle./S. Dagdeviren et al. *FASEB J*. 2017. Vol. 31. P. 701–710. doi: 10.1096/fj.201600832R
177. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration / B. Deng et al. *J. Immunol*. 2012. Vol. 189. P. 3669–3680. doi: 10.4049/jimmunol.1103180
178. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. / V. Carriere et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. Vol. 104. P. 282–287. doi: 10.1073/pnas.0606854104

179. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats / R. Takagi et al. *J Appl Physiol*. 2011. Vol. 110(2). P. 382-8.
180. Influence of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on Endogenous Mechanisms of Skeletal Muscle Repair/Regeneration / Flaminia Chellini et al. *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20 (683). doi:10.3390/ijms20030683.
181. Ingraham J.M., Hauck R.M., Ehrlich H.P. Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing? *Plast Reconstr Surg*. 2003. Vol.112. P. 844–854.
182. Inhibition of the activating receptor type-2B pathway restores regenerative capacity in satellite cell-depleted skeletal muscle. / L. Formicola et al. *Front. Physiol*. 2019. 9:515. doi: 10.3389/fphys.2018.00515
183. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. / Patidar M. et al. *Cytokine & growth factor reviews*. 2016. Vol.31. P. 49–59.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.06.001>
184. Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect. / S. Busquets et al. *Int. J. Mol. Med*. 2005. Vol. 16(3). P. 471–476.
185. Interleukin-15 facilitates muscle regeneration through modulation of fibro/adipogenic progenitors. / X. Kang et al. *Cell Commun. Signal*. 2018. Vol. 16:42. doi: 10.1186/s12964-018-0251-0
186. Intra-articular injections of platelet-rich plasma releasate reduce pain and synovial inflammation in a mouse model of osteoarthritis / Sohrab Khatab et al. *Am J Sports Med*. 2018 Mar;46(4):977-986.
187. Irie K., Uchiyama E., Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee*. 2003. Vol. 10 (1). P. 93–96.
188. Isolation, culture, and differentiation of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) from skeletal muscle. / R. N. Judson et al. *Methods Mol. Biol*. 2017. Vol. 1668. P. 93–103. doi: 10.1007/978-1-4939-7283-8-7

189. Jin R., Zhang L., Zhang Y. Does platelet-rich plasma enhance the survival of grafted fat? An update review. *Int J Clin Exp Med*. 2013. Vol. 6(4). P. 252-8.
190. Jorgensen U. The role of rules and refereeing in injury prevention. *Sport injuries. Basic principles of prevention and treatment*. Kiev: Olympus. Lit., 2002. P. 184–189.
191. Kang H.J., Kang E.S. Ideal concentration of growth factors in rabbit's flexor tendon culture. *Yonsei Med J*. 1999. Vol. 40. P. 26–29.
192. Kruger J.P., Hondke S., Endres M. Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. *J. Orthop. Res*. 2012. Vol. 30, No 6. P. 845–852.
193. Kruger J.P., Ketzmar A.K., Endres M. Human platelet-rich plasma induces chondrogenic differentiation of subchondral progenitor cells in polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*. 2014. Vol. 102. No 4. P. 681–692.
194. Lacci K.M., Dardik A. Platelet rich Plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med*. 2010. Vol.83 (1). P. 1–9.
195. Learning about PRP using cell-based models / K. Beizel et al. *Muscles, ligaments and tendons Journal*. 2014. № 4 (1). P. 38-45.
196. Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running / C. Malm et al. *J Physiol*. 2004. Vol. 556(Pt 3). P. 983-1000. doi:10.1113/jphysiol.2003.056598
197. Liew, F. Y., Girard, J.P., Turnquist, H. R. Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol*. Vol. 16, P. 676–689. doi: 10.1038/nri.2016.95
198. Lin J.C., Liang W.M. Outcomes after fixation for undisplaced femoral neck fracture compared to hemiarthroplasty for displaced femoral neck fracture among the elderly. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015. Vol. 16. P. 199.
199. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair / Elena Rigamonti et al. *BioMed research international vol*. 2014. (2014): 560629. doi:10.1155/2014/560629

200. Management of femoral neck fractures in the young patient: A critical analysis review. / T. Pauyo et al. *World J Orthop.* 2014. Vol. 5 (3). P. 204–217.
201. Manske P.R., Gelberman R.H., Lesker P.A. Flexor tendon healing. *Hand Clin.* 1985. Vol. 1. P. 25–34.
202. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy / S. Schiaffino et al. *FEBS J.* 2013. Vol. 280(17). P. 4294-314. doi: 10.1111/febs.12253. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23517348.
203. Meryem B. Baghdadi, Shahrageim Tajbakhsh. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Developmental Biology.* 2018. Vol. 433(2). P. 200-209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.026>
204. Mesenchymal precursor cells in adult nerves contribute to mammalian tissue repair and regeneration. / M. J. Carr et al. *Cell Stem Cell.* 2019. Vol. 24, P. 240–256. doi: 10.1016/j.stem.2018.10.024
205. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity / R. Khokha et al. *Nat Rev Immunol.* 2013. Vol. 13, N9. P. 649–665.
206. Mishra A., Harmon K., Woodall J., Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012. Vol. 13(7). P. 1185-95. doi: 10.2174/138920112800624283. PMID: 21740373.
207. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappa B inhibition via HGF. / P. Bendinelli et al. *J Cell Physiol.* 2010. Vol. 225. P. 757-66.
208. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression / J. Chang et al. *J Hand Surg.* 1998. Vol. 23A (6). P. 1052-9
209. Molloy T, Wang Y., Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003. Vol. 33. P. 381– 394.
210. Morphofunctional human platelet analysis by vital staining / M.S. Makarov et al. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2013. Vol. 156 (9). P. 388–391.

211. MR Imaging of Muscle Trauma: Anatomy, Biomechanics, Pathophysiology, and Imaging Appearance / D. V. Flores et al. *Radiographics*. 2018. Vol. 38(1). P. 124-48.
212. Murphy M.B., Blashki D., Buchanan R.M. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, No 21. P. 5308–5316.
213. Muscle Injuries Biology and Treatment. / Tero A. H. Järvinen et al. *The American Journal of Sports Medicine*. 2015. Vol. 33, No. 5. P. 745-764 DOI: 10.1177/0363546505274714
214. Muscle injuries: biology and treatment./ T.A Järvinen et al. *Am J Sports Med*. 2005. Vol. 33(5):745-64. doi: 10.1177/0363546505274714
215. Muscle injuries: optimising recovery. / T.A Järvinen et al. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007. Vol. 21(2). P. 317-31.
216. Muscle satellite cell cross-talk with a vascular niche maintains quiescence via VEGF and notch signaling. / M. Verma et al. *Cell Stem Cell*. 2018. Vol. 23. P. 530–543. doi: 10.1016/j.stem.2018.09.007
217. Muscle strain injuries. / T.A Järvinen. et al. *Current Opinion in Rheumatology*. 2000. Vol. 12(2). P. 155-161.
218. Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy. / C. S. Fry et al. 2017. *Cell Stem Cell*. Vol. 20. P. 56–69. doi: 10.1016/j.stem.2016.09.010
219. Nikolidakis D., Jansen J.A. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: Literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008. Vol 14. P. 249-258.
220. Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. /Feige Peter et al. *Cell stem cell*. 2018. Vol. 23, 5 P. 653-664. doi: 10.1016/j.stem.2018.10.006

221. Orienting muscle stem cells for regeneration in homeostasis. / P. Feige et al. *Aging Dis. Cell Stem Cell*. 2018. Vol. 23 P. 653–664. doi: 10.1016/j.stem.2018.10.006
222. Ozdemir B., Okte E.J. Treatment of intrabony defects with beta tricalciumphosphate alone and in combination with platelet rich plasma. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012. Vol. 100 (4). P. 976–983.
223. Pannérec A., Marazzi G., Sassoon D. Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche. *Trends Mol. Med*. 2012. Vol. 18. P. 599–606. doi: 10.1016/j.molmed.2012.07.004
224. Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence/ Enis Kostallari et al. *Development (Cambridge, England)*. 2015. Vol. 142, 7. P. 1242-53. doi:10.1242/dev.115386
225. Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. / D. Fiore et al. *Stem Cell Res*. 2016. Vol. 17. P. 161–169. doi: 10.1016/j.scr.2016.06.007
226. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. / R. B. Nunes et al. *J. Appl. Physiol*. 2008. Vol. 104. P. 1641–1647. doi: 10.1152/jappphysiol.00062.2008
227. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. / S. Harrison et al. *Am J Sports Med*. 2011. Vol. 39. P. 729-734.
228. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. / G.F. Pierce et al. *J Cell Biol*. 1989. Vol. 109 (1). P. 429-40.
229. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: Evidence to support its use. / E. Kon et al. *Knee Surg Sports Trauma ta Arthrosc*. 2011 Vol. 19. P. 516-527.
230. Platelet-Rich Plasma / D.K. Adrian et al. *Clinics in Sports Medicine*. January 2019. Volume 38, Issue 1. P. 17–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csm.2018.08.001>

231. Platelet-rich plasma for muscle injuries: A systematic review of the basic science literature. / Kyle N Kunze et al. *World J Orthop.* 2019. Vol. 10(7). P. 278–291. doi: 10.5312/wjo.v10.i7.278
232. Platelet-rich plasma growth factors and pro– and anti-inflammatory properties / H. El-Sharkawy et al. *J Periodontol.* 2007. № 78 (4). P. 667-669.
233. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing./ P.M.Denapoli et al. *The American journal of sports medicine* 2016. Vol. 44, 8 P. 1962-71. doi:10.1177/0363546516646100
234. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial / R.J. de Vos et al. *JAMA.* 2010. Vol. 303. №2. P. 144–149.
235. Platelet-rich plasma promotes healing of osteoporotic fractures. / L. Chen et al. *Orthopedics.* 2013. Vol. 36. №6. P. 687–694.
236. Platelet-rich plasma reduces the oxidative damage determined by a skeletal muscle contusion in rats. / R.P. Martins et al. *Platelets.* 2016 Vol. 27(8). P. 784-790. doi: 10.1080/09537104.2016.1184752.
237. Platelet-Rich Plasma Stimulates Cell Proliferation and Enhances Matrix Gene Expression and Synthesis in Tenocytes From Human Rotator Cuff Tendons With Degenerative Tears. / C. Hyunchul et al. *Am J Sports Med.* 2012. Vol. 40. P. 1035.
238. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis / K. Akeda et al. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. № 12 Vol. 14. P. 1272-80.
239. Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF- β inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro / R. Kelc et al. *PLoS One.* 2015.Vol.13;10(2):e0117302. doi: 10.1371/journal.pone.0117302.
240. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. / T.E. Foster et al. *Am J Spans Med.* 2009. Vol. 37. P. 2259-2272.

241. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions / E. Kon et al. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010. № 18. P. 472-479.

242. Poor repair of skeletal muscle in aging mice reflects a defect in local, interleukin-33-dependent accumulation of regulatory T cells. / W. Kuswanto et al. *Immunity.* 2016. Vol. 44. P. 355–367. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.009

243. Postinjury exercise and platelet-rich plasma therapies improve skeletal muscle healing in rats but are not synergistic when combined./ Paola Contreras-Muñoz et al. *The American journal of sports medicine.* 2017. Vol 45, 9. P. 2131-2141. doi:10.1177/0363546517702864

244. Proliferation–promoting effect of platelet–rich plasma on human adipose–derived stem cells and human dermal fibroblasts / N. Kakudo et al. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008. Vol. 22. P. 1352–1360.

245. Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. / M.I. Boyer et al. *Journal of Orthopaedic Research.* 2006. Vol. 19. P. 869-872. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(01\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00017-1)

246. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. / J.M. Embil et al. *Wound Repair Regen.* 2000. Vol. 8(3). P. 162-8.

247. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury/ T.A. Jarvinen et al. *Muscles Ligaments Tendons.* 2013. Vol. 3(4). P. 337–345.

248. Regeneration of mandibular osteoradionecrosis defect with platelet rich plasma gel. / Scala M. et al. *In Vivo.* 2010. Vol. 24 (6). P. 889–893.

249. Research progress of platelet rich plasma in promoting bone regeneration and repairing / Y. Zhao et al. 2010. Vol. 24, №8. P. 1004–1008.

250. Rumman M, Dhawan J, Kassem M. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem Cells.* 2015 Vol. 33(10). P. 2903-2912. doi:10.1002/stem.2056

251. Senzel L., Gnatenko D. V., Bahou W. F. The platelet proteome. *Current Opinion in Hematology*. 2009. Vol. 5. P. 329–333.
252. Serrano A. L., Muñoz-Cánoves. P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 2010. Vol.1, 316(18). P. 3050–3058. doi: 10.1016/J.YEXCR.2010.05.035
253. Sharma P., Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon*. 2005. Vol. 3. P. 309–316.
254. Skeletal muscle regeneration is delayed by reduction in Xin expression: consequence of impaired satellite cell activation? / A.A. Nissar, B. Zemanek, R. Labata et al. *Am. J. Physiol. Cell.* — 2012. — Vol. 302(1). — P. 220—227.
255. Souza J de, Gottfried C. Muscle injury: review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol.* 2013. Vol.23(6). P. 1253-60.
256. Spindler K.P., Nanney L.B., Davidson J.M. Proliferative responses to platelet-derived growth factor in young and old rat patellar tendon. *Connect Tissue Res.* 1995. Vol. 31. P. 171–177.
257. Stem cells transplantation in the treatment of patients with cerebral palsy. / T. Petriv et al. *Cell and Organ Transplantation*. 2020. Vol. 8(1). P. 76-80. doi:10.22494/cot.v8i1.107
258. Stimulation of regeneration of hyaline cartilage with osteochondral injury in experiment / M. Sh. Khubutiya et al. *Bull Exp Biol Med.* 2008. Vol. 11. P. 597–599.
259. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF- β 1 increases postoperative range of motion. / J. Chang et al. *Plast Reconstr Surg.* 2000. Vol. 105 (1). P. 148-55.
260. Surgical management of hip fractures: an evidencebased review of the literature. I: femoral neck fractures. / R.G. Miyamoto et al. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008. Vol. 16 (10). P. 596–607.
261. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo C.L Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta.* 2011;32(4):311-5. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21733573.

262. Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J., Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*. 2011;32(4):311-5. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21733573.

263. Talboys R., Pickup L., Chojnowski A. The management of intracapsular hip fractures in the 'young elderly' internal fixation or total hip replacement? *Acta Orthop Belg*. 2012. Vol. 78 (1). P. 41–48.

264. The alarmins IL-1 and IL-33 differentially regulate the functional specialisation of Foxp3 + regulatory T cells during mucosal inflammation / F. Alvarez et al. *Mucosal Immunol*. 2019. Vol. 12. P. 746–760. doi: 10.1038/s41385-019-0153-5

265. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. / T. Pufe et al. *Virchows Arch*. 2001. Vol. 439. P. 579–585.

266. The anti-inflammatory and matrix-restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis / E.A. Sundman et al. *Am J Sport Med*. 2014. № 42 (1). P. 35-41.

267. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: A review of the literature. / J. Alsousou et al. *J. Bone Joint Surg. Br*. 2009. Vol.91. P. 9S7-996

268. The effect of muscle loading on flexor tendon-to-bone healing in a canine model. / Stavros Thomopoulos et al. *J. Orthop Res*. 2008. Vol. 26(12). P. 1611-1617. doi: 10.1002/jor.20689.

269. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair / Y. Mifune et al. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013. Vol. 21, No 1. P. 175–185.

270. The effect of thrombin activation of platelet rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. / V. Han et al. *J Bone Joint Surg A*. 2009. Vol. 91 (6). P. 1459–1470.

271. The efficacy of platelet rich plasma in grafted maxillae. A randomised clinical trial. / M. Badr et al. *Eur J Oral Implantol*. 2010. Vol. 3 (3). P. 233–244.

272. The efficacy of platelet-rich plasma in grafted maxil lae. A randomised clinical trial. / M. Badr et al. *European Journal Oral Implantology*. 2010. Vol. 3, №3. P. 233–244.

273. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. / A.C. Dreux et al. *Atherosclerosis*. 2006. Vol. 186(1). P. 38–53.

274. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. / F. Graziani et al. *Clin Oral Implants Re*. Vol. 17. P. 212-219.

275. The influence of patient and wound variables on healing of venous leg ulcers in a randomized controlled trial of growth–arrested allogeneic keratinocytes and fibroblasts / J. C. Lantis et al. *J. Vasc. Surg*. 2013.Vol. 2. P. 433–439.

276. The redox-dependent regulation of satellite cells following aseptic muscle trauma (SpEED): study protocol for a randomized controlled trial. / Konstantinos Papanikolaou et al. *Trials*. 2019; Vol. 20: P. 469. Published online 2019 Jul 1. doi: 10.1186/s13063-019-3557-3

277. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes / Magdalena Kozakowska et al. *J. Muscle Res. Cell Motil*. 2015. Vol. 36. P. 377–393. DOI 10.1007/s10974-015-9438-9.

278. The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor(VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. / W. Petersen et al. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2003. Vol. 123. P. 475– 480.

279. The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection. / Wasterlain Amy S. et al. *Am J Sports*. 2013. Vol. 41(1). P. 186-193.

280. Thrombocytá gardag plazmával kezelt periferias idegrekonstrukcio vizsgalata patkanyokon. / T. Zoltan et al. *Magyar traumatologia ortopedia kezsebeszet plasztikai sebeszet*. 2015. Vol. 58(1). P. 63-72

281. Tidball James G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system Nature Reviews. *Immunology*. 2017. Vol. 17(3). P. 165-178.

282. Tidball James G., Wehling-Henricks Michelle. Shifts in macrophage cytokine production drive muscle fibrosis. *Nature Medicine*. 2015. Vol. 21(7). P. 665-6.

283. Tidball James G., Welc Steven S. Macrophage-Derived IGF-1 Is a Potent Coordinator of Myogenesis and Inflammation in Regenerating Muscle. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015. Vol. 23(7). P. 1134-1135.

284. Tidball J. G., Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2010. Vol. 298. P.1173–1187. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009

285. Tidball J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. Volume 288 (2). P. R345-R353

286. Toumi H., F'guyer S., Best T.M. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J. Anat.* 2006. Vol. 208. P. 459-470.

287. Treatment of chronic non–healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series / M. Suthar et al. *Biomed. Sci.* 2017. Vol. 24 (16).. P. 16.

288. Treatment of chronic non–healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series / M. Suthar, et al. *Biomed. Sci.* 2017. Vol. 1. P. 16.

289. Treatment of Muscle Injuries with Platelet-Rich Plasma: a Review of the Literature. / K. Setayesh et al. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2018. Vol. 11. P. 635–642. <https://doi.org/10.1007/s12178-018-9526-8>

290. Trends in 1029 trauma deaths at a level 1 trauma center: Impact of a bleeding control bundle of care / Blessing T Oyeniya et al. *Injury*. 2017. Vol. 48 (1). P. 5–12.

291. Tssymbaliyk V.I., Tretyak I.B., Gatsky A.A. Biocompatible heterogeneous porous gel matrix NeuroGel™ promotes regeneration of rat sciatic nerve within tubular silicone prosthesis (experimental study). *Acta Neurochirurgica*. 2014. Vol. 156, Issue 8. P. 1591-1598.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача

1. Dzhyvak V. H., Khlibovska O. I., Klishch I. M. Role of endogenic intoxication in muscle injury in experiment. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2019. Vol. 5, № 2. P. 122–127.
2. Морфофункціональні зміни в легенях та печінці у ранній період після травматичного ураження м'язів в експерименті / В. Г. Дживак, І. М. Кліщ, Т. В. Дацко, О. І. Хлібовська. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 1. С. 74–77.
3. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Особливості цитокінового профілю у сироватці крові щурів за умови корекції травми м'язів збагаченою тромбоцитами плазмою крові. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2020. № 3. С. 53–58.
4. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на стан системи протеїнази/інгібітори протеїназ при травматичному ураженні м'язів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 3. С. 72–80.
5. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Ефективність збагаченої тромбоцитами плазми крові в індукції загоєння м'язової тканини в експериментальному дослідженні. *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*. 2020. № 3 (91). С. 36–43.
6. Influence of PRP on morphological changes in muscle in the early period after traumatic muscle injury in the experiment / V. Dzhyvak, I. Klishch, T. Datsko, O. Khlibovska. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 6. P. 171–178.
7. Research of stimulating efficiency of blood allogeneic plasma fractions on cell proliferation in vitro conditions / V. G. Dzhyvak, A. I. Dovhalyuk, I. R. Paliy, I. M. Klishch. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 8. P. 559–569.

8. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Травматичне ураження м'язової тканини та роль збагаченої тромбоцитами плазми. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXI наук.-практ. конф. , 7 червня 2018 р. Тернопіль, 2018. С. 223–224.

9. Dzhyvak V. The level of tba – active products under the conditions of traumatic muscle damage. *Матеріали XXIII міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 15–17 квітня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 308–309.

10. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Антиоксидантна система захисту при експериментальній травмі м'язів. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXII наук.-практ. конф., присв. 165-річчю від дня народження І. Я. Горбачевського, 13 червня 2019 р. Тернопіль, 2019. С. 84.

11. Дживак В. Особливості морфологічних змін у легенях, нирці, печінці у посттравматичному періоді травматичного ураження м'язів стегна в експерименті. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 211.

12. Дживак В. Рівень активності ред-окс системи у різних групах щурів з травматичним ушкодженням м'язів в експерименті під впливом збагаченої тромбоцитами плазми крові. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 211-212.

13. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми крові на проліферативну активність клітинних культур / В. Г. Дживак, А. І. Довгалюк, І. Р. Палій, І. М. Кліщ. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 червня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 58.

14. Дживак В. Г. Особливості методики отримання плазми, збагаченої тромбоцитами. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 278–279.

15. Дживак В. Г., Кліщ І. М. Динаміка показників протеїназо/інгібіторної системи крові при травматичному ураженні м'язів в експерименті. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали XII Всеукраїнської наук.-практ. конф., присв. Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології 110-річчю проф. Бергера Е. Н. і 90-річчю проф. Маркової О. О. Галицькі читання II, 29–30 жовтня 2020 р. м. Тернопіль, 2020. С. 40–41.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- підсумкова LXI науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 7 червня 2018 р.) (доповідь і публікація);
- XXIII міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених. (м. Тернопіль . 15-17 квітня 2019 р.). (доповідь і публікація);
- підсумкова LXII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 165-річчю від дня народження Івана Яковича Горбачевського (м. Тернопіль, 13 червня 2019 р.). (доповідь і публікація);
- Перший галицький хірургічний форум «Інноваційні технології в хірургії» 3 нагоди 100-річчя з дня народження Юрія Теофіловича Коморовського. (м. Тернопіль, 24.01.2020 р.) (доповідь);
- XXIV міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених. (м. Тернопіль, 13-15 квітня 2020 р.) (доповідь і публікація);
- XXIV міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених. (м. Тернопіль 13-15 квітня 2020 р.) (доповідь і публікація);
- підсумкова LXIII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», (м. Тернопіль, 12 червня 2020 р.) (доповідь і публікація);
- VIII науково-практична конференція з міжнародною участю. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів. (м. Тернопіль, 23-24 вересня 2020 р.) (доповідь і публікація);
- XII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», присвяченої Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології ТДМІ 110-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О. Галицькі читання II (м. Тернопіль, 29-30 жовтня 2020 р.) (доповідь і публікація).

ДОДАТОК В.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з науково-педагогічної роботи
Вищого державного навчального
закладу України
«Буковинський державний медичний університет»
доц. Геруш І. В.
« 20 » жовтня 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція впровадження:** Матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичне обґрунтування застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів»
2. **Установа-розробник, автор:** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», 58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2, кафедра медицини катастроф та військової медицини.
Розроблювач: Дживак Володимир Георгійович
3. **Джерело інформації:** Дживак В. Г., Кліщ І. М. Ефективність збагаченої тромбоцитами плазми крові в індукції загоєння м'язової тканини в експериментальному дослідженні. *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*. 2020. №3 (91). С. 36-43. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2020.3.11461>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», 58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2, кафедра медицини катастроф та військової медицини.
5. **Результати застосування:** Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри медицини катастроф та військової медицини Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», на лекціях та практичних заняттях у 2020 р..
6. **Ефективність впровадження, відповідність критеріям, викладеним у джерелі:** Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо загоєння м'язової тканини після травматичних ушкоджень, впровадження відповідає критеріям, викладеним у джерелі інформації.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:
доцент кафедри травматології та ортопедії
Вищого державного навчального
закладу України
«Буковинський державний
медичний університет»,
к. мед. наук, доцент

Ковальчук П.Є.

ДОДАТОК В.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор

з науково-педагогічної роботи

Вищого державного навчального

закладу України

«Буковинський державний медичний університет»

доц. Геруш І. В.


«28» травня 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція впровадження:** Особливості змін показників ендогенної інтоксикації при м'язовій травмі.
2. **Ким запропоновано (адреса, виконавець):** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», 58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2, кафедра патологічної фізіології.
Розроблювач: Дживак Володимир Георгійович
3. **Джерело інформації:** Dzhyvak V.H., Khlibovska O.I., Klishch I.M. Role of endogenous intoxication in muscle injury in experiment. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2019, Volume 5, Issue 2, p. 122-127
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», 58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2, кафедра патологічної фізіології.
5. **Форма впровадження:** Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на лекціях та практичних заняттях.
6. **Ефективність впровадження, відповідність критеріям, викладеним у джерелі:** Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо ефективність впровадження відповідає критеріям, викладеним у джерелі інформації.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Завідувач кафедри
патологічної фізіології
Вищого державного навчального
закладу України
«Буковинський державний
медичний університет»,
док. мед. наук, професор



Роговий Ю. Є.

ДОДАТОК В.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Шульгай А. Г.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція впровадження: Матеріали кандидатської дисертації 'Патогенетичне обґрунтування застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів'

2. Ким запропоновано (адреса, виконавець): Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медицини катастроф та військової медицини, м. Тернопіль, Майдан Волі 1, 46001, Україна.

Розроблювач: Дживак Володимир Георгійович

Джерело інформації: Дживак В. Г., Кліщ І. М. Ефективність збагаченої тромбоцитами плазми крові в індукції загоєння м'язової тканини в експериментальному дослідженні. Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука. 2020. №3 (91). С. 36-43. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2020.3.11461>

3. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медицини катастроф та військової медицини.

4. Результати застосування: Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри медицини катастроф та військової медицини Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України на лекціях та практичних заняттях у 2020 р..

5. Ефективність впровадження, відповідність критеріям, викладеним у джерелі: Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо загоєння м'язової тканини після травматичних ушкоджень, впровадження відповідає критеріям, викладеним у джерелі інформації.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження:
Зав. кафедри медицини катастроф
та військової медицини
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
док. мед. наук, проф.

Гудима А. А.

ДОДАТОК В.4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Шульгай А. Г.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Пропозиція впровадження:** Матеріали кандидатської дисертації 'Патогенетичне обґрунтування застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів'
- 2. Ким запропоновано (адреса, виконавець):** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фізіології з основами біоетики та біобезпеки. Тернопіль, Майдан Волі 1, 46001, Україна.
Розроблювач: Дживак Володимир Георгійович
Джерело інформації: Дживак В. Г., Кліщ І. М. Особливості цитокінового профілю у сироватці крові шурів за умови корекції травми м'язів збагаченою тромбоцитами плазмою крові. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2020. №3. С. 53 -58. DOI: <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2020.3.11518>
- 3. Базова установа, яка проводить впровадження:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фізіології з основами біоетики та біобезпеки.
- 4. Результати застосування:** Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри фізіології з основами біоетики та біобезпеки Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України на лекціях та практичних заняттях у 2020-2021 рр..
- 5. Ефективність впровадження, відповідність критеріям, викладеним у джерелі:** Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо показників цитокінового профілю у сироватці крові шурів за умови корекції травми м'язів збагаченою тромбоцитами плазмою крові, впровадження відповідає критеріям, викладеним у джерелі інформації.
- 7. Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:
Зав. кафедри фізіології з основами
біоетики та біобезпеки
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
док. мед. наук, проф.

Вадзюк С. Н.

ДОДАТОК В.5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи

Тернопільського національного

медичного університету імені

І. Я. Горбачевського МОЗ України

проф. Шульгай А. Г.

«24» вересня 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція впровадження: Матеріали кандидатської дисертації 'Патогенетичне обґрунтування застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів'

2. Ким запропоновано (адреса, виконавець): Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, м. Тернопіль, Майдан Волі 1, 46001, Україна.

Розроблювач: Дживак Володимир Георгійович

Джерело інформації: Dzhyvak V.H., Khlivovska O.I., Klishch I.M. Role of endogenic intoxication in muscle injury in experiment. International Journal of Medicine and Medical Research 2019, Volume 5, Issue 2, p. 122-127. DOI 10.11603/IJMMR.2413-6077. 2019.2.10310

3. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії.

4. Результати застосування: Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри медичної біохімії на лекціях та практичних заняттях у 2019-2020 р..

5. Ефективність впровадження, відповідність критеріям, викладеним у джерелі: Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо динаміки показників ендогенної інтоксикації, впровадження відповідає критеріям, викладеним у джерелі інформації.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження:
Зав. кафедри медичної біохімії
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
док. мед. наук, доц.

Підручна С. Р.

ДОДАТОК В.6

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Шульгай А. Г.



« 23 » серпня 2020 р.
АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція впровадження:** Матеріали кандидатської дисертації 'Патогенетичне обґрунтування застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові та мезенхімальних стовбурових клітин для корекції травматичних ушкоджень м'язів'
2. **Ким запропоновано (адреса, виконавець):** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, патологічної фізіології м. Тернопіль, Майдан Волі 1, 46001, Україна.
Розроблювач: Дживак Володимир Георгійович
Джерело інформації: V.H. Dzhyvak, O.I. Khlivovska, I.M. Klishch Role of endogenous intoxication in muscle injury in experiment. International Journal of Medicine and Medical Research 2019, Volume 5, Issue 2, p. 122-127. <https://doi.org/10.11603/ijmmr.2413-6077.2019.2.10310>
3. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології.
4. **Результати застосування:** Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України на лекціях та практичних заняттях у 2019-2020 р..
5. **Ефективність впровадження, відповідність критеріям, викладеним у джерелі:** Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо динаміки показників ендогенної інтоксикації при ушкодженні м'язів, впровадження відповідає критеріям, викладеним у джерелі інформації.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:
Зав. кафедри патологічної фізіології
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
док. мед. наук, проф.

Денефіль О. В.