

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу аспірантки кафедри хірургії та хвороб дрібних тварин Білоцерківського національного аграрного університету

Шевченко Світлани Миколаївни

на тему: **«Клініко-експериментальне обґрунтування імплантації тромбоцитарних концентратів та їх композитів із кальцій-фосфатною керамікою за переломів кісток у собак»**

представлену на здобуття ступеня доктора філософії

зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина»

галузі знань 21 «Ветеринарна медицина»

Актуальність теми дисертації. Уламкові переломи, у більшості випадків – 18,75-60%, є надзвичайно складними за біомеханікою травми, оскільки супроводжуються об'ємними кістковими дефектами, втратою регенеративного потенціалу кісткової тканини і частотою ускладнень (незрощень, псевдосуглобів, контрактур, остеомієлітів) 7–32%. Наявність кісткового дефекту в зоні перелому зумовлює нестабільність остеосинтезу через зменшення площі контакту між кістковими уламками. Формування гематоми під час репаративного остеогенезу є ключовим тригерним пусковим чинником, оскільки вона є джерелом малодиференційованих остеогенних клітин і факторів росту. Під час проведення репозиції кісткових уламків та їх остеосинтезу, особливо за осколкових переломів, відбувається руйнування згустку гематоми та його видалення разом із кістковими уламками, що суттєво впливає на ранні етапи регенерації.

Тому, вивчення впливу аутофібрину, збагаченого тромбоцитами та його комбінації з гідроксиапатитом та β -трикальційфосфатом за репаративного остеогенезу різних видів кісткової тканини є актуальним та важливим. Оскільки, саме таке комплексне поєднання складових імплантанту надає потужних остеогенних властивостей для клітинного типу регенерації та можливості оптимізації консолідації уламків, що дозволяє прискорити реконструкцію структур кісткової тканини за переломів трубчастих кісток.

Отже, вивчення впливу імплантації тромбоцитарних концентратів та їх композитів із кальцій-фосфатною керамікою на репаративний остеогенез за переломів кісток у собак в дисертаційній роботі Шевченко С.М. має надзвичайно важливе прикладне значення для застосування у ветеринарній хірургії.

Актуальність теми дисертаційної роботи підтверджується тим, що дослідження виконано згідно з планом програми з підготовки доктора філософії (2018–2022 рр.) та є складовою виконання науково-дослідної роботи у межах завдань науково-технічної державної теми № 0119U102083 НАН України.

Зв'язок роботи з державними науковими (галузевими) програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у межах програми з підготовки доктора філософії (2018–2022 рр.) та є складовою науково-дослідної роботи «Доклінічні дослідження виробів з розроблених біоматеріалів»

(договір № 48/1 від 27.08.2019 р.) у межах завдань науково-технічної державної теми НАН України «Розробка та доведення до впровадження в клінічну практику кісткових імплантатів різного призначення з новітніх біоматеріалів для відновлення кісткової тканини та функції кісток після поранень в бойових діях» № 0119U102083, у якій дисертантка була виконавцем підрозділу.

Наукова новизна досліджень і отриманих результатів дисертаційної роботи. У дисертаційній роботі Шевченко С.М. сформульовано ряд нових наукових положень у пріоритетному клініко-патогенетичному обґрунтуванні імплантації різних форм аутотромбоцитарних концентратів та остеозаміщення композитом аутологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами, із кальцій-фосфатною керамікою для оптимізації консолідації переломів довгих трубчастих кісток у собак.

Зокрема, здобувачем:

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

- доведено гістоморфологічно, що в діапазоні центрифугування 100–400 g відбувається рівномірний розподіл тромбоцитів у збагачених ними згустках аутофібрину;

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

- доведено, що композитне остеозаміщення за модельних переломів у кролів поряд з ранньою остеобластичною реакцією супроводжується інтенсивним неоангіогенезом з формуванням елементів пластинчастої кістки вже на 14-ту добу і поступовою біодеградацією кальцій-фосфатної кераміки та утворенням остеонів (на 21-у добу), що прискорює виповнення кісткових дефектів повноцінним регенератом в 1,3–1,4 раза за макроморфологічними і гістоморфологічними критеріями;

- встановлено, що гематологічним і патохімічним відображенням остеоіндуктивного впливу PRF-матеріалів на репаративний остеогенез у

кролів є прискорене усунення посттравматичної еритроцитопенії та гіперкоагуляційного синдрому, реактивний тромбоцитоз упродовж 7–11-ої доби, менш інтенсивна реакція гострої фази, двохфазне підвищення в крові оксиду азоту як маркера неоангіогенезу, раннє, з піком на 14-ту добу, підвищення активності лужної фосфатази, яка превалює над ферментативною остеорезорбцією;

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

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

- заразом встановлено, що патохімічна фаза репаративного остеогенезу за імплантації різних форм аутоPRF у ділянки переломів та композитного остеозаміщення характеризується вищими концентраціями в крові оксиду азоту, по-стадійними піками активності кісткового ізоферменту лужної фосфатази та тартратрезистентної кислоти фосфатази, які свідчать про ранній ангіо- і остеогенез на фоні оптимізованої остеорезорбції, динамічне формування та ремоделювання кісткового регенерату.

Ступінь обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій. Метою дисертаційної роботи було клініко-експериментально обґрунтувати імплантацію збагаченого тромбоцитами аутофібрину та його композиту із кальцій-фосфатною керамікою за переломів довгих трубчастих кісток у собак. Досягнення поставленої мети стало можливим за вирішення поставлених багатопланових завдань, які мали логічне узгодження з детальним аналізом сучасного стану проблеми щодо використання тромбоцитарних концентратів різних поколінь, методів виготовлення та збагачення, формуванням дослідних груп лабораторних тварин для вибору матеріалу з найкращими характеристиками та послідуочого використання для клінічного застосування на собаках. Здобувачка методологічно вірно провела дослідження з використанням низки сучасних та класичних високоінформативних методів досліджень: клінічних, рентгенологічних, макроморфологічних, гістологічних (фарбування гематоксиліном і еозином), гематологічних (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити), гемостазологічних (антитромбін-III, розчинний фібрин), біохімічних (гемоглобін, альбумін, загальний білок, кальцій, фосфор, активність загальної лужної фосфатази, її

кісткового ізоферменту та тартратрезистентної кислотої фосфатази, оксид азоту (NO), гаптоглобін, α -2 макроглобулін) та статистичних на достатній кількості матеріалу за різних рівнів структурної організації та метаболічного статусу. Мета роботи досягнута, її результати відповідають завданням, сформульовані науковим положенням належною мірою обґрунтовані та достатньо апробовані.

Висновки логічні і витікають із результатів, особисто проведених дисертанткою досліджень, які проаналізовані та узагальнені, достовірність яких підтверджується наведеним в дисертації табличним, графічним, фотографічним матеріалом та результатами статистичної обробки даних.

Зокрема, вірогідність наведених у дисертації результатів підтверджується достатньою кількістю якісних фотодокументів, отриманих на основі рентгенограм, макро- та мікропрепаратів.

Вищенаведене свідчить, що наукові положення, висновки та рекомендації дисертації в достатній мірі теоретично, методологічно та методично обґрунтовані.

Апробація результатів дослідження, повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, зокрема 1 у виданні, включеному в міжнародну наукометричну базу даних Scopus, та 6 – у виданнях, що належать до переліку наукових видань України: науковому віснику ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету (3) та у віснику Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького (3) та науково-методичні рекомендації: «Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині» – 1.

Результати досліджень дисертантки були представлені на достатній кількості міжнародних та державних наукових і науково-практичних конференціях і опубліковані у 7 тезах доповідей наукових конференцій.

Аналіз структури та змісту дисертації. Дисертаційна робота виконана згідно чинних вимог. На початку наведені анотації (українською та англійською мовами) та список публікацій здобувачки (с. 2-19). Далі наведений зміст роботи (с. 20-21). Для зручності сприйняття термінології авторкою складений Перелік умовних позначень та скорочень (с. 22-23).

В розділі «Вступ» (с. 24-37) дисертанткою наведено обґрунтування вибору теми дослідження за аналізу та посилання на значну кількість сучасних вітчизняних та закордонних авторів, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, мета дослідження та поставленні завдання для її досягнення, об'єкт і предмет дослідження, використані методи досліджень, описано наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, наведено особистий внесок здобувача, апробація матеріалів дисертації на міжнародних, державних наукових і науково-практичних конференціях, вказано кількість наукових публікацій, структура та обсяг дисертації.

У розділі 1. «Огляд літератури» (с. 38-69) авторкою узагальнено літературні наукові дані з дослідження поставленої проблеми у 3 підрозділах: 1.1. «Ключові молекулярно-біологічні механізми регенеративних властивостей кісткової тканини»; 1.2. «Принципи і засоби регенеративної

медицини»; 1.3. «PRP-технології: біологічні, технологічні та клінічні аспекти застосування у ветеринарній медицині» з 4 пунктами: 1.3.1. «Біологічні властивості тромбоцитів і фібрину»; 1.3.2. «Методики отримання плазми, збагаченої тромбоцитами»; 1.3.3. «Методики отримання фібрину, збагаченого тромбоцитами»; 1.3.4. «Використання PRP-технологій у ветеринарній медицині». Завершено розділ 1 підрозділом 1.4. «Висновок з огляду літератури», де наведено логічне обґрунтування необхідності детального вивчення та узагальнення властивостей обраних матеріалів.

У розділі 2. «Вибір напрямів досліджень, матеріал та методи виконання роботи» (с. 70-94) здобувачкою наведено 2 підрозділи: 2.1. «Методологія та схеми досліджень», де описано етапи проведених досліджень (3 етапи) та їх об'єм; та 2.2. «Характеристика використаних матеріалів та методи дослідження», у якому охарактеризовано матеріали та методи для проведення клініко-експериментальних та статистичних досліджень.

Розділ 3. «Оптимізація режимів центрифугування за одержання збагачених тромбоцитами плазми та фібрину» (95-108) містить 2 підрозділи: 3.1. «Цитологічне дослідження плазми і макроморфологія фібринових згустків одержаних за різних режимів центрифугування крові» та 3.2. «Гістоморфологічна характеристика PRF, одержаного за різних величин відцентрової сили центрифугування крові», із встановленими оптимальними режимами центрифугування за одержання тромбоцитарних концентратів та з виявленими ділянками концентрування тромбоцитів. Розділ 3 відповідає I етапу схеми проведених досліджень – Оптимізація протоколів приготування PRP та PRF за режимами центрифугування для приготування (100g, 400g, 735g, 906g, 1843g, кролі n=55).

Розділ 4. «Клініко-експериментальне обґрунтування впливу prp і різних типів prf та їх композиції з кальцій-фосфатною керамікою на репаративний остеогенез у кролів» (109-200) структурований відповідно II етапу схеми досліджень – Вивчення впливу продуктів PRP-технологій на репаративний остеогенез, за модельних переломів губчастої і компактної кісткової тканини у кролів – 7 груп (здорові кролі (n=12), контрольна група з кров'яним згустком (n=12), дослідна група з PRP (n=12), дослідна група з PRF (n=12), дослідна група з i-PRF (n=12), дослідна група з ксенологічним PRF (n=12), дослідна група з ГТ + PRF (n=12)). Наведено результати клінічних, рентгенологічних, макроморфологічних, гістологічних, гематологічних (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, гемоглобін), біохімічних (Са, Р, кисла і лужна фосфатази, NO, загальний білок, альбумін, гаптоглобін, розчинний фібрин, антитромбін-III) та статистичних досліджень відповідно 0, 3, 7, 14, 21, 42-ій добі. Містить 5 підрозділів: 4.1. «Динаміка клініко-рентгенологічних змін», 4.2. «Макроморфологічне дослідження кісткових регенератів», 4.3. «Гістоморфологічна оцінка регенератів кісткової тканини», 4.4. «Динаміка гематологічних показників», 4.5. «Біохімічні показники» з двома пунктами, зокрема: 4.5.1. «Динаміка маркерів кісткового метаболізму» та 4.5.2. «Динаміка показників гострої фази». За комплексом клініко-рентгенологічних характеристик, макро- і гістоморфологічних та біохімічних досліджень

матеріалом з найбільш вираженими остеοіндуктивними властивостями виявився фібрин, збагачений тромбоцитами та його комбінація із гідроксиапатитом і β-трикальційфосфатом. Остеοімплантація фібрину, збагаченого тромбоцитами у модельні дірчасті дефекти кісткової тканини кролів за гістоморфологічними критеріями оптимізує консолідацію переломів у компактній кістковій тканині за самостійного використання PRF у 1,3 раза ($p < 0,001$), за комбінованого поєднання PRF+HA/β-TCP-700 у 1,4 раза ($p < 0,001$), а в губчастій у 1,3 раза ($p < 0,001$).

Розділ 5. «Клініко експериментальне обґрунтування рґр-технологій та їх комбінацій з кальцій-фосфатною керамікою у лікуванні переломів довгих трубчастих кісток у собак» (с. 201-232) відображає результати III етапу схеми досліджень: Клініко-експериментальне обґрунтування використання PRF та HA/β-TCP-700 з PRF, за переломів довгих трубчастих кісток у собак – 3 групи (контрольна група – остеосинтез ($n=10$); дослідна група остеосинтез, місцево PRF, і-PRF ($n=10$), дослідна група остеозаміщення, ГТ + PRF ($n=10$)). Відображено результати клінічних, рентгенологічних, гематологічних (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, гемоглобін), біохімічних (Са, Р, кисла і лужна фосфатази, NO, загальний білок, альбумін, гаптоглобін, розчинний фібрин, антитромбін-III, α2-макроглобулін) та статистичних методів дослідження за різних термінів контролю – до оперативного втручання, 3, 7, 14, 21, 42-а доба. Розділ 5 містить 2 підрозділи: 5.1. «Динаміка клініко-рентгенологічних критеріїв» та 5.2. «Динаміка гематологічних та біохімічних показників» із, відповідно, 3 пунктами: 5.2.1. «Гематологічні показники», 5.2.2. «Показники кісткового метаболізму», 5.2.3. «Динаміка показників гострої фази у собак». В результаті III етапу досліджень виявлено, що імплантація і-PRF чи PRF у міжуламкові простори за неосколкових та остеозаміщення композитом кальцій-фосфатної кераміки з PRF за осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак скорочує терміни клініко-рентгенологічно підтвердженої їх консолідації порівняно з використанням лише накісткового остеосинтезу в 1,3 та 1,5 рази ($p < 0,001$). При цьому рентгенологічна візуалізація та динаміка біохімічних маркерів кісткового метаболізму засвідчують менший рівень запально-резорбтивних процесів у ділянці кісткової травми та раннє і динамічне формування кісткового регенерату завдяки ендоостальному остеогенезу, особливо у випадку композитного остеозаміщення.

В розділі 6. «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» (с. 233-246) здобувачкою наведено аналіз та узагальнення результатів проведених досліджень шляхом співставлення та порівняння із літературними даними досліджень інших авторів. За результатами роботи зроблено 14 висновків (с. 247-251) та 5 пропозицій виробництву (с. 252-253).

Список використаних джерел (с. 254-293) складено згідно існуючих вимог щодо бібліографічних посилань та містить 337 джерел, у тому числі латиницею. Додатки (с. 294-310) містять акти та картки зворотного зв'язку про впровадження матеріалів дисертаційної роботи у навчальний процес, наукові дослідження та у ветеринарну практику клінік дрібних домашніх тварин

України (Додаток А), наукові праці, опубліковані за темою дисертації (Додаток Б), відомості про апробацію результатів дисертації (Додаток В).

Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності. Під час рецензування дисертаційної роботи не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації, текстових запозичень чи інших порушень доброчесності дисертантом. Усі ідеї та положення викладені в роботі, належать авторці.

Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертації. Попри високий науковий та прикладний характер результатів досліджень, до окремих змістовних та структурних елементів дисертаційної роботи варто висловити певні зауваження та побажання:

1. Якщо регенерація переломів у кролів більшості дослідних груп відбувалася за первинним остеогенезом (через формування ретикулофіброзної кісткової тканини та її наступну диференціацію у пластинчасту), як розвиваються кістки черепа та нижньої щелепи, постає питання чи здатна така регенерована пластинчаста кісткова тканина у трубчастій кістці в майбутньому виконувати відповідні стато-локомоторні функції як і материнська пластинчаста кісткова тканина, яка сформувалася за вторинним остеогенезом. Адже відомо, що пластинчасті кісткові тканини за різних типів остеогенезу мають відмінності у структурі та механічних властивостях.

2. На рис. 3.5 с. 101 та рис. 3.6 с. 102 не чітко візуалізуються лейкоцити, рис. 3.6 – в позначеннях не відображено на що вказує цифра 3, не відповідає кратність збільшення $\times 400$ та $\times 1000$ зображенню клітин на фото.

3. На с. 3, 4, 79, 116, 160, 166 «у двох типах кісткової тканини: губчастій – гребінь великогомілкової кістки з медіального боку; компактній», «губчаста кістка, компактна кістка» використовуються не коректна термінологія. За Міжнародною гістологічною номенклатурою є два типи кісткової тканини: ретикулофіброзна (грубоволокниста, первинна губчаста) та пластинчаста. Пластинчаста кісткова тканина може бути компактною та губчастою будови.

4. На с. 123–125, 127, 129, 130, 134, 136, 137 використано назви «Макрокартина, мікрокартина, гістокартина», які не є загальноприйнятими в морфології за опису макро- та мікроскопічних досліджень. Можливо замінити на макроструктура, макроморфологія, гістологічна структура. Також невдалим виразом є «макро- і гістологічна оцінки» с. 35, більш доцільно – макро- і мікроскопічна.

5. У тексті дисертації зустрічаються незначні розбіжності у формулюванні терміну: «ксенологічний фібрин, збагачений тромбоцитами» (ст. 87, 109), а на ст. 116 та ст. 122 зустрічається термін ксеногенний PRF, бажано використовувати однакове формулювання по всьому тексту роботи.

Висловлені побажання та зауваження, не мають принципового характеру, тому не зменшують наукової цінності та практичної значущості результатів аналізованого дослідження і не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи Шевченко Світлани Миколаївни.

Представлена робота виконана на високому методологічному рівні, написана науковим стилем мовлення, грамотно, чітко та акуратно. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею, містить нові науково обґрунтовані результати проведених здобувачкою досліджень, які виконують конкретне наукове завдання – клініко-патогенетичне обґрунтування імплантації різних форм аутотромбоцитарних концентратів та остеозаміщення композитом аутологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами, із кальцій-фосфатною керамікою для оптимізації консолідації переломів довгих трубчастих кісток у собак, що має істотне значення для галузі знань 21 «Ветеринарна медицина».

Загальний висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Шевченко Світлани Миколаївни на тему: «Клініко-експериментальне обґрунтування імплантації тромбоцитарних концентратів та їх композитів із кальцій-фосфатною керамікою за переломів кісток у собак» за обсягом проведених досліджень, з використанням сучасних методів, сформована наукова новизна і практичне значення одержаних результатів, можливість результатів дослідження впровадження у виробництво відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року «Про затвердження Порядку присудження ступеню доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її авторка Шевченко Світлана Миколаївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії (PhD) зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» з галузі знань 21 «Ветеринарна медицина».

Рецензент,

кандидат ветеринарних наук, доцент,
доцент кафедри анатомії та гістології
ім. П.О. Ковальського
факультету ветеринарної медицини
Білоцерківського національного
аграрного університету

(підпис)

Ольга БЕВЗ

Підпис Ольги БЕВЗ засвідчує
Начальник відділу документообігу і
кадрового забезпечення Білоцерківського
національного аграрного університету



(підпис)

Олена ЮРЧЕНКО

03 липня 2023 р.