На правах рукописи

Герасимов Сергей Александрович

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПРИ ЛОКАЛЬНЫХ ДЕФЕКТАХ

(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.01.15 – травматология и ортопедия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

г. Нижний Новгород

2019

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Тенилин Николай Александрович**
Доктор медицинских наук

Официальные оппоненты: **Корнилов Николай Николаевич**
Доктор медицинских наук, профессор кафедры травматологии и ортопедии, заведующий отделением №17, ведущий научный сотрудник отделения патологии коленного сустава Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

Лазко Федор Леонидович
Доктор медицинских наук, профессор кафедры травматологии и ортопедии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (г. Москва).

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Новосибирск).

Защита состоится «____»_____2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.061.06 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Приволжского исследовательского медицинского университета по адресу: г. Нижний Новгород, ул. Медицинская 3а.

Автореферат разослан «___» _____2019г.

Учёный секретарь диссертационного совета:
доктор медицинских наук, профессор Мухин Алексей Станиславович.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

С развитием контактных видов спорта, ростом дорожного и бытового травматизма увеличивается и число повреждений суставной поверхности. Наиболее уязвимыми являются крупные суставы: коленный, плечевой, тазобедренный, голеностопный (Колесников М.А., 2012; Filardo G., 2013). Несмотря на динамичное развитие современных методов исследования, до сих пор сложно представить истинную распространенность повреждений суставного хряща (Корнилов, Н.Н., 2005; Johnstone B., 2013; Richer D.L. 2016).

По сравнению с пациентами с остеоартрозом, пациенты, имеющие изолированные повреждения суставной поверхности значительно моложе, ведут более активный образ жизни, и, как правило, более требовательны к результатам лечения и менее склонны к принятию ограничений в физической активности (Hunt H.E., 2014; Jordan M., 2016). Несвоевременное и неадекватное лечение ограниченных повреждений суставной поверхности приводит к раннему развитию генерализованного артроза и инвалидизации пациента (Кудашев Д.С., 2008; Diekman B.O., 2010; Harris J.D., 2011).

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день описано большое количество способов и алгоритмов лечения пациентов с локальными повреждениями суставного хряща (Негреева М.Б., 2014). Несмотря на широкий спектр способов от остеоперфорации до тканевой биоинженерии ни один из них не приводит к полноценному органоспецифическому восстановлению хрящевой гиалиновой ткани и не может быть универсальным для каждого повреждения (Vasiliadis H.S., 2010; Zeng L., 2016).

Цель исследования

Обоснование необходимости и разработка в эксперименте биомедицинского клеточного продукта для восстановления суставного хряща при локальных дефектах.

Задачи исследования

1.Провести анализ результатов остеоперфоративных способов хирургического лечения пациентов с локальными повреждениями суставного хряща коленного сустава в зависимости от площади дефекта.

2. Определить оптимальную структуру носителя в составе биомедицинского клеточного продукта в эксперименте на основании оценки цитотоксичности и особенностей адгезивных свойств коллагеновых матриц с разными характеристиками.

3. Провести сравнительную оценку характера регенераторных процессов области сформированного дефекта суставного хряща без замещения и при использовании биомедицинских клеточных продуктов с разными характеристиками в эксперименте на кроликах.

4. Оценить эффективность применения разработанного биомедицинского клеточного продукта для восстановления ограниченных дефектов суставного хряща с позиции доказательной медицины.

Научная новизна исследования:

Впервые показано, что применение остеоперфоративных способов хондропластики ограниченных повреждений суставного хряща коленного сустава наиболее целесообразно при площади дефекта не более 2 $см^2$.

Доказано, что коллагеновые матрицы, используемые в качестве носителей в составе БМКП, имеют разную адгезивную способность, которая определяет эффективность заполнения области дефекта суставного хряща.

Впервые разработан биомедицинский клеточный продукт на основе коллагеновой матрицы «Остеопласт» с предварительно выращенными в ее структуре аллогенными

стромальными клетками костного мозга.

Установлено, что применение биомедицинского клеточного продукта на основе коллагеновой матрицы «Остеопласт» приводит к формированию хрящевой гиалиновой ткани с анатомическими и гистотопографическими характеристиками близкими к интактному суставному хрящу.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработан и изучен на доклиническом этапе новый биомедицинский клеточный продукт для восстановления ограниченных повреждений суставного хряща, состоящий из проницаемой коллагеновой матрицы «Остеопласт» с выращенными в её структуре аллогенными стромальными клетками костного мозга.

Расширены показания к применению способов хондропластики с использованием биомедицинских клеточных продуктов.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология диссертационного исследования основана на проведении всестороннего анализа литературных данных по проблеме оперативного лечения пациентов с локальными повреждениями суставного хряща, выявлении путей улучшения результатов, разработке новых биомедицинских клеточных продуктов. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты исследования, комплекс современных методов исследования. Для объективной оценки полученных результатов были использованы методы описательной статистики и доказательной медицины.

Положения, выносимые на защиту

1.Эффективность остеоперфоративных способов хондропластики для восстановления суставного хряща при локальных повреждениях зависит от площади дефекта.

2.Использование биомедицинского клеточного продукта на основе проницемой коллагеновой матрицы «Остеопласт» с выращенными в ее структуре аллогенными стромальными клетками костного мозга для хондропластики суставного хряща при ограниченных повреждениях обеспечивает наиболее полное замещение области дефекта по сравнению с применением биомедицинского клеточного продукта на основе двухслойной непроницаемой мембраны «Chondro Gide».

3.Формирование гиалиноподобной хрящевой ткани со структурной организацией присущей истинному гиалиновому суставному хрящу возможно после имплантации в область сформированного дефекта биомедицинского клеточного продукта на основе матрицы «Остеопласт».

Степень достоверности полученных результатов

В настоящем диссертационном исследовании степень достоверности основана на достаточном количестве наблюдений, современных методах исследования и статистической обработке данных. Результаты исследования проанализированы согласно принципам доказательной медицины и с помощью традиционных методов дескриптивной статистики.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы обсуждены и одобрены на заседаниях Нижегородской ассоциации травматологов-ортопедов 2012, на Всероссийской конференции молодых ученых «Приоровские чтения» 2013, Межрегиональной научно-практической конференции «Ключевые концепции реконструктивной хирургии крупных суставов» 2015, конференции молодых ученых Северо-Западного Федерального округа «Актуальные вопросы травматологии и ортопедии» 2016.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования, изложенные в работе, внедрены в лечебную работу травматологического отделения ГБУЗ НО ГКБ №40, используются в лекционных материалах

кафедры «Травматологии, ортопедии и ВПХ им. М.В. Колокольцева» ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором определены цель и задачи работы, проведен анализ литературных данных, медицинских карт стационарных больных, разработано и внедрено «Устройство для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности» (Патент РФ №164921), самостоятельно выполнены хирургические вмешательства всем экспериментальным животным, с их последующим наблюдением в отделении экспериментальной хирургии с виварием. Инструментальные методы исследования экспериментальных образцов проводились совместно с сотрудниками группы патологической анатомии и консервации тканей. Автор владеет всеми описанными техниками оперативных вмешательств.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 14.01.15. – травматология и ортопедия: клиническая разработка методов лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательной системы и внедрение их в клиническую практику.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 5 - в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований. Патент «Устройство для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности» №164921.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, трех глав с изложением анализа и осуждением результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиографический список содержит 50 отечественных и 141 зарубежных источников. Диссертация содержит 8 таблиц и 59 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Дизайн и объекты исследования

В рамках клинического этапа диссертационного исследования проведен проспективный анализ результатов лечения 52 пациентов, которым на базе ортопедического отделения взрослых «ННИИТО» Минздрава России с 2011 по 2015 годы выполнялись артроскопические остеоперфоративные методики стимуляции хондрогенеза. Для характеристики патологического повреждения суставного хряща коленного сустава применяли классификацию Outerbridge (1961).

Критериями включения пациентов в исследование были возраст от 18 до 45 лет, степень повреждения суставного хряща 3-4 ст по Outerbridge, степень повреждения хряща смежной суставной поверхности не более 2 ст по Outerbridge, локализация дефекта суставного хряща на мыщелках и блоке бедренной кости и надколеннике, площадь дефекта от 1 до 4 $см^2$, неэффективность консервативного лечения.

Все пациенты были разделены на три группы:1 группа – 15 пациентов, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялась абразивная хондропластика; 2 группа – 16 – пациентов, которым выполнялась туннелизация; 3 группа – 21 пациент, которым выполнялся микрофрактуринг.

Для оценки эффективности применения известных методик хондропластики в зависимости от площади дефекта суставного хряща все группы были разделены на 2 подгруппы: 1 - площадь дефекта хряща $S \leq 2см^2$; 2- площадь дефекта $2 < S \leq 4см^2$.

Во время экспериментального этапа исследования велась разработка биомедицинского клеточного продукта (БМКП) для восстановления суставного хряща при локальных дефектах. В качестве каркасов-носителей использовались коллагеновые матрицы с разной структурой: «Chondro Gide» и «Остеопласт». Вторым компонентом в составе БМКП стали стромальные клетки костного мозга (СККМ) кролика. Экспериментальные исследования включали изучение цитотоксичности и адгезивных свойств коллагеновых каркасов-носителей in vitro, а также выявление особенностей регенерации области локального дефекта суставного хряща с применением подготовленных БМКП in vivo. Эксперименты проводились на кроликах породы «Серый великан» 6-11 месячного возраста весом от 2900 до 5000 г. Животные были разделены на три группы: Контрольная включала 9 особей (14 суставов), группа Опыт 1 – 6 особей (12 суставов), группа Опыт 2 – 6 особей 12 суставов. Животных выводили из эксперимента через 3 и 6 месяцев после операции.

Методы исследования

Клиническое исследование включало сбор анамнеза, общий осмотр, оценка амплитуды движений в суставе.

Магнитно-резонансную томографию использовали для уточнения локализации и распространенности локального дефекта суставного хряща, а также для оценки суставного хряща смежной поверхности.

С помощью 100-бальной шкалы Joseph & Kaufman у всех пациентов проводилась оценка функции коленного сустава в динамике: до операции, через 3,6,12,24.

Проводили корреляционный анализ между размером дефекта и результатами лечения с применением различных остеоперфоративных способов хондропластики.

Во время экспериментального этапа состояние культуры клеток в динамике оценивали с помощью инвертированного микроскопа «Leica DMI 3000B», оснащенного программой визуализации изображений LAZ. V. 3.4

Для проведения дифференцировки применяли набор Hyman Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, USA). В качестве специфических красителей для оценки дифференцировки использовали: для окраски липидных вакуолей - Oil Red (Sigma, США), для выявления солей кальция в процессе дифференцировки в остеобласты - ализариновый красный (Sigma, США), хондрогенную дифференцировку оценивали по образованию в среде специфических шариков (pellet).

Фенотипирование клеточной взвеси проводили на цитофлуориметре FACS CANTO II (Betman Dickinson, USA) с использованием моноклональных антител CD 45, CD105, CD 44 с соответствующими изотипическими контролями

Методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cytation 5 (BioTek, USA) визуализировали клетки не только на поверхности, но внутри мембран. Прижизненное окрашивание ядер клеток, адгезировавшихся на материале, проводили с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen™). Для маркировки живых клеток и характеристики их морфологии использовали кальцеин (Calcein AM, BD Pharmingen™).

Для формирования однотипных цилиндрических дефектов суставного хряща было разработано и использовано «Устройство для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности» (Патент РФ №164921).

При оценке микроскопической картины с помощью гистоморфологического метода учитывали клеточный состав ткани регенерата, степень заполнения дефекта, структуру поверхностных и глубоких слоев, окрашивание матрикса, состояние пограничных зон гиалинового хряща, сращение образовавшейся ткани с краями дефекта, степень восстановления

субхондрального слоя кости. Декальцинацию выполняли с использованием среды Biodec-R (Bio-Optica). Стандартная гистологическая проводка осуществлялась на аппарате ExcelsiorES (ThermoScientific). После проводки изготовлялись парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar(ThermoScientific). Серийные срезы толщиной 4-6 микрон получали на микротоме MicromHM 325 (ThermoScientific). Срезы окрашивались гематоксилином и эозином и заключались в монтирующую среду. Микроскопирование и фотодокументирование проводились с использованием морфометрического комплекса LeicaDMR.

С помощью морфометрического метода проводили измерение высоты восстановленной хрящевой пластинки. Для оценки результатов измерений был предложен и использован коэффициент восстановления области дефекта (КВ), рассчитываемый как отношение высоты восстановленной ткани в области дефекта к высоте суставного хряща в зонах, граничащих с дефектом. Если КВ был равным 1 - высота восстановленной хрящевой ткани соответствовала показателям пограничной зоны, тогда дефект считали полностью восстановленным. Если КВ был равным или выше 0,85, то исход лечения считали благоприятным, если КВ был ниже 0,85 - исход лечения расценивался как неблагоприятный.

Проводилась оценка эффективности использования различных БМКП. Для расчета прогностической ценности положительного результата (значение КВ≥0,85) и отношения шансов выстраивалась четырехпольная таблица с последующим определением показателей. Сравнивались результаты групп Опыт 1 (БМКП СККМ+«Chondro Gide») и Опыт 2 (БМКП СККМ+ «Остеопласт») через 6 месяцев наблюдений, вычислялась частота неблагоприятных исходов (КВ<0,85) в группе Опыт 1 (ЧИК) и группе Опыт 2 (ЧИЛ). Также оценивались снижение абсолютного риска (САР), снижение относительного риска (СОР), число больных, которых необходимо лечить каждым исследуемым способом для предотвращения неблагоприятного исхода у одного больного (ЧБНЛ) и отношение шансов (ОШ). Показатели снижения относительного и абсолютного рисков рассчитывали с 95% доверительным интервалом.

Сравнивали результаты измерений в опытных группах с измерениями в контрольной группе. Также проводили сравнения между опытными группами.

Проверка статистических гипотез эксперимента проводилась с использованием критериев статистического метода «Случай-контроль» (Котельников Г.П., 2000). Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости соответствующего статистического критерия $p < 0,05$.

Статистическая обработка результатов была проведена на персональном компьютере Intel ® Core (TM) i3 CPU в среде Windows XP с использованием программы Microsoft Office Excel 2007, статистического пакета Statistica 6.0 фирмы STATSOFT.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты хирургического лечения пациентов с ограниченными дефектами суставного хряща.

С помощью шкалы Joseph & Kaufman через 3,6,12,24 месяца проведена сравнительная оценка эффективности различных остеоперфоративных способов хондропластики в зависимости от площади повреждения. (Таблица 1).

Таблица 1 - Количественные показатели шкалы Joseph & Kaufman в динамике (M ± σ)

Период наблюдения\Группы	Абразивная хондропластика (n=15)	Туннелизация (n=16)	Микрофрактурирование (n=21)	P
До операции	64,9±6,50	66,4±5,55	66,2±5,38	$P_{1,2}$=0,5116 $P_{1,3}$=0,5313 $P_{2,3}$=0,9193
3 месяца	71,3±4,82	76,4±4,30	76,3±5,10	$P_{1,2}$=0,0041 $P_{1,3}$=0,0055 $P_{2,3}$=0,9480
6 месяцев	77,1±5,46	81,2±5,56	80,2±5,62	$P_{1,2}$=0,0499 $P_{1,3}$=0,1075 $P_{2,3}$=0,6124
12 месяцев	83,9±6,94	88,7±5,67	87,0±5,75	$P_{1,2}$=0,0450 $P_{1,3}$=0,1508 $P_{2,3}$=0,3929
24 месяца	88,3±7,95	91,1±6,17	89,0±6,41	$P_{1,2}$=0,2821 $P_{1,3}$=0,7824 $P_{2,3}$=0,3171
P	$P_{до,3}$=0,0048 $P_{3,6}$=0,0046 $P_{6,12}$=0,0059 $P_{12,24}$=0,1176 $P_{до,24}$=0,0001	$P_{до,3}$=0,0001 $P_{3,6}$=0,0105 $P_{6,12}$=0,0007 $P_{12,24}$=0,2610 $P_{до,24}$=0,0001	$P_{до,3}$=0,0001 $P_{3,6}$=0,0235 $P_{6,12}$=0,0004 $P_{12,24}$=0,2936 $P_{до,24}$=0,0001	

Изменение количественных показателей шкалы Joseph & Kaufman в динамике демонстрировало постепенное их увеличение с максимальными значениями через 24 месяца после оперативного вмешательства, при этом статистически значимых отличий между группами не наблюдалось.

Известно, что результаты лечения любыми вариантами хондропластики ухудшаются с течением времени. Однако, согласно исследованию Solheim E., высокие показатели субъективной оценки коленного сустава, полученные в краткосрочном периоде наблюдений (до 2-х лет), позволяют надеяться на сохранение высокого процента хороших и отличных результатов в течение 10-14 лет, при этом имеет значение исходная площадь дефекта суставного хряща (Solheim E., 2014).

По рекомендациям многих авторов показанием к остеоперфоративным способам хондропластики является локальное полнослойное повреждение суставного хряща на площади от 2 до 4 см². (Стадников А.А., 2008; Королев А.В., 2010; Mithoefer K., 2009; Mirza M.Z., 2015).

Однако ряд исследователей считают, что при выявлении дефектов более 2 см² необходимо применять варианты хондропластики, основанные на трансплантации костно-хрящевых блоков или клеточных культур (Брянская А.И., 2010; Benthien J.P., 2011; Lim H. C., 2012; Jordan M., 2016). Для выявления закономерности между площадью дефекта суставного хряща и результатами лечения путем применения остеоперфоративных способов хондропластики была вычислена частота хороших и отличных результатов в зависимости от площади дефекта (Таблица 2).

Таблица 2 - Частота хороших и отличных результатов через 24 месяца в зависимости от размера дефекта.

Размер дефекта, $см^2$\Группа	Абразивная хондропластика (n=15)		Туннелизация (n=16)		Микрофрактуринг (n=21)		P (X^2_{yet})
	N	Абс/Относ., %	N	Абс/Относ.,%	N	Абс/Относ.,%	
$S \leq 2$ (1)	10	10/100	14	14/100	15	15/100	$P_{аб,т}$=0,0558 $P_{аб,м}$=0,8089 $P_{т,м}$=0,0169
$2<S\leq4$ (2)	5	1/20	2	1/50	6	4/67	$P_{аб,т}$=0,8948 $P_{аб,м}$=0,3474 $P_{т,м}$=0,6733

Анализируя результаты лечения пациентов с локальными дефектами суставного хряща с использованием остеоперфоративных методик стимуляции хондрогенеза через 24 месяца после операции, хорошие и отличные результаты отмечены у всех пациентов с исходной площадью повреждения ≤ 2 $см^2$, при этом не наблюдали статистически значимой разницы между применяемыми методиками. У 7 пациентов с площадью дефекта $2<S\leq4$ $см^2$ отмечены удовлетворительные и неудовлетворительные результаты, из них 4 пациента из группы абразивной хондропластики, 1 – из группы туннелизации, 2 – из группы микрофрактуринга. При этом у 4 пациентов сохранялся неудовлетворительный результат, у 3 - удовлетворительный, однако количественные показатели шкалы Joseph & Kaufman были выше исходного уровня у всех пациентов. В 5 случаях для коррекции патологии выполнена мозаичная аутохондропластика (материалы не включены в текущее исследование), 2 пациента отказались от дальнейшего хирургического лечения.

Проведен корреляционный между исходной площадью дефекта суставного хряща и результатами лечения, соответствующими показателям шкалы Joseph & Kaufman, который демонстрирует обратную связь через 3 и 24 месяца после операции. (Таблица 3).

Таблица 3 - Корреляционный анализ между площадью дефекта и результатами лечения через 3 и 24 месяца.

Срок наблюдения \Группа	Абразивная хондропластика (n=15)	Туннелизация (n=16)	Микрофрактуринг (n=21)
3 мес	γ= -0,67 (P=0,0164)	γ= -0,70 (P=0,0168)	γ= -0,61 (P=0,0039)
24 мес	γ= -0,78 (P=0,0126)	γ= -0,56 (P=0,0038)	γ= -0,80 (P=0,0010)

Учитывая данные таблицы 3 следует, что лечение пациентов с ограниченными дефектами суставного хряща с помощью остеоперфоративных методик стимуляции хондрогенеза нецелесообразно при площади дефекта свыше 2 см^2. Вероятно, это связано с малым количеством стромальных клеток костного мозга, проникающих в область дефекта через сформированные отверстия (Dewan A. K., 2014) Сгусток крови, формирующийся в области дефекта после остеоперфораций, содержит около 100 СККМ, тогда как эквивалентный объем суставного хряща содержит около 10 млн клеток (Nicolini A.P., 2014). Это значительно ограничивает количество клеток, способных дифференцироваться в хондроциты, а вместе с тем и образование гиалинового хряща в этой области.

Оценивая результаты данного этапа исследования можно сделать вывод, что применение остеоперфоративных способов хондропластики является эффективным для восстановления суставного хряща при локальных дефектах площадью не более 2 см^2. При этом статистически значимой разницы между абразивной хондропластикой, туннелизацией и микрофрактурингом не выявлено. Возможно применение любого из вышеуказанных методов в зависимости от оснащения операционной и личных предпочтений хирурга.

Результаты экспериментальных исследований

Анализ цитотоксичности и адгезивных свойств матриц-носителей в составе БМКП

Для анализа цитотоксичности и особенностей адгезивных свойст матриц-носителей, используемых в составе БМКП, была выделена культура СККМ. При определении фенотипа клеток выявлено, что большинство (более 94%) экспрессировали CD 105+, CD 44+ (более 97%), панлейкоцитарный антиген CD 45 не экспрессировался. Следовательно, фенотип клеток, выделенных из костного мозга кролика, можно представить как CD 105+, CD 44+, CD 45 -, что соответствует фенотипу СККМ.

При оценке цитотоксичности наблюдали за культурой СККМ нанесенной на матрицы-носители: «Chondro Gide» и «Остеопласт». В течение всего времени наблюдения (96 часов) не фиксировали нарушения целостности и характера монослоя, морфологии клеток. Клетки сохраняли типичную фибробластоподобную форму, контуры клеток были четкими, отростки выражены. Через 96 часов культивирования, как в чашках с опытными образцами, так и в контрольных (без образцов), клетки формировали конфлюэнтный монослой, культура была снята с помощью смеси трипсина с ЭДТА, жизнеспособность и плотность клеток в опытных и контрольных сериях не отличалась (Таблица 4).

Таблица 4 - Изменение плотности клеток при культивировании с образцами матриц «Chondro Gide» (Группа1) и «Остеопласт» (Группа 2).

	Плотность клеток на 1 см^2 (M ± σ)			Жизнеспособность в % (M ± σ)		
Опыт \группа	№1	№2	№3	№1	№2	№3
Контроль	9899 ± 160,6	11006,66± 225,4	12600±124.4	98,8 ±1,2	97,9 ± 2,3	98,6 ± 1,1
Группа 1	9800,4± 106,4	10999,16± 198,8	12480,4±240 ,1	98,9 + 0,9	98,3 ± 1,4	99,1 ± 1,2
Группа 2	9775,86± 196,51	10927,22± 209,31	12550,8± 109,2	99% ± 0,8	98,1± 1,3	98,9 ± 1,6
P	$P_{кон,гр1}$=0,1229 $P_{кон,гр2}$=0,1423 $P_{гр1,гр2}$=0,7324	$P_{кон,гр1}$=0,2433 $P_{кон,гр2}$=0,0844 $P_{гр1,гр2}$=0,2205	$P_{кон,гр1}$=0,0895 $P_{кон,гр2}$=0,1799 $P_{гр1,гр2}$=0,2049	$P_{кон,гр1}$=0,4177 $P_{кон,гр2}$=0,3331 $P_{гр1,гр2}$=0,3979	$P_{кон,гр1}$=0,3221 $P_{кон,гр2}$=0,4068 $P_{гр1,гр2}$=0,3722	$P_{кон,гр1}$=0,1721 $P_{кон,гр2}$=0,3155 $P_{гр1,гр2}$=0,3777

Полученные данные демонстрируют отсутствие статистически значимой разницы по плотности и жизнеспособности клеток в контрольной и опытных группах.

Таким образом, обе исследуемые матрицы и «Chondro Gide», и «Остеопласт» не являлись токсичными для СККМ кролика, так как не фиксировались нарушения морфологии и пролиферативной активности клеток в их присутствии на протяжении всего периода наблюдения.

При оценке адгезии клеток с помощью флуоресцентной микроскопии на поверхности и в порах матрицы «Остеопласт» через 24 часа фиксировалось большое количество окрашенных Hoechst 3334 (синее окрашивание) флуоресцирующих ядер клеток (Рис. 1). Использование кальцеина (Рис.2а,б) позволяло увидеть клетки типичной для СККМ веретеновидной формы на поверхности каркаса и подтверждало их жизнеспособность.

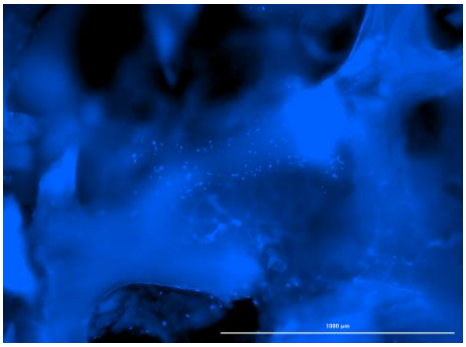


Рис. 1. СККМ кролика на матрице «Остеопласт» через 24 часа после пересева (окраска Hoechst 3334, ув. объектив 4х, окуляр 10х)

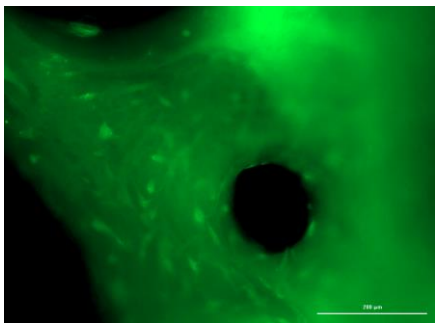
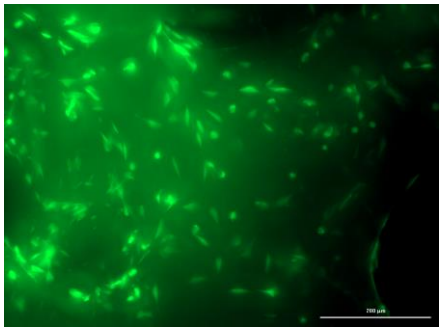
а  б 

Рис. 2 а,б. СККМ кролика на матрице «Остеопласт» через 24 часа после пересева (окраска Calcein, ув. объектив 10х, окуляр 10х)

Полученные результаты демонстрируют, что СККМ кролика хорошо адгезируются, распластываются и сохраняют жизнеспособность на матрице «Остеопласт». При дальнейшем культивировании СККМ способны мигрировать с мембраны с сохранением пролиферативной активности.

На поверхности мембраны «Chondro Gide» через 24 часа после пересева фиксировалось большое количество флуоресцирующих ядер клеток (окраска Hoechst 3334), равномерно распределенных на поверхности мембраны (Рис.3). Применение прижизненной окраски кальцеином (Рис. 4а, б) демонстрировало, что на поверхности мембраны ««Chondro Gide» СККМ кролика распластываются, сохраняя жизнеспособность и типичную фибробластоподобную форму.

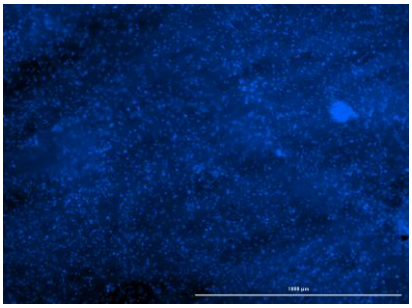


Рис. 3. СККМ кролика на мембране «Chondro Gide» через 24 часа после пересева (окраска Hoechst 3334, увеличение объектив 4х, окуляр 10х)

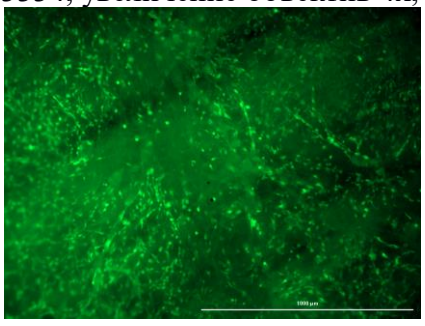
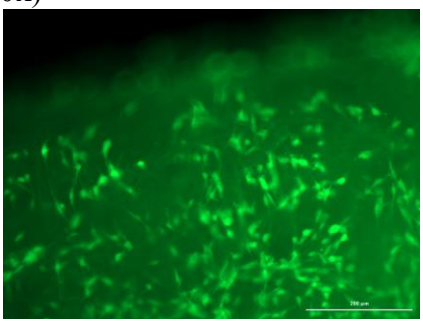
а  б 

Рис.4а, б. СККМ кролика на мембране «Chondro Gide» через 24 часа после пересева (окраска Calcein, а - ув. объектив 4х, окуляр 10х; б - ув. объектив 10х, окуляр 10х)

Использование метода флуоресцентной микроскопии в сочетании с прижизненной окраской СККМ на матрицах позволило увидеть, что структура мембраны «Chondro Gide» обеспечивает достаточно равномерное распределение СККМ по ее поверхности, в то время как пористая структура матрицы «Остеопласт» способствовала к распределению клеток, как по поверхности, так и в глубине пор.

При оценке миграции СККМ кролика с матриц отмечено, что уже через 24 - 48 часов фиксировалось появление единичных фибробластоподобных клеток на пластике непосредственно около образцов «Остеопласт», количество которых увеличивается в процессе наблюдения. К 96 - 120 часам наблюдения клетки формировали субконфлюэнтный монослой

(Рис. 5). Таким образом, СККМ кролика переносятся вместе с образцами «Остеопласт», сохраняя жизнеспособность и способность к пролиферации. При использовании мембраны «Chondro Gide» около образцов через 24 часа фиксировались единичные клетки, но пролиферации клеток и образования монослоя не отмечено.

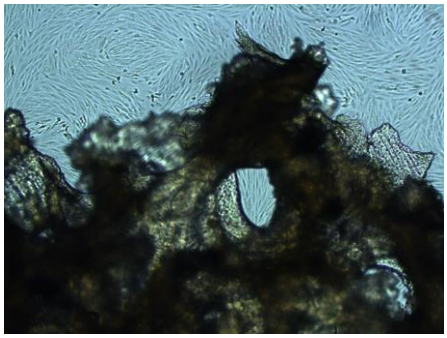


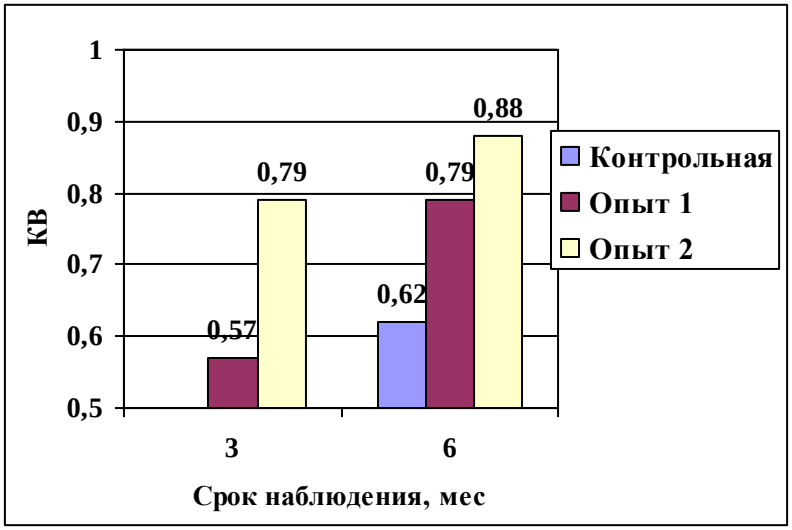
Рис. 5. Миграция СККМ кролика с матрицы «Остеопласт» и формирование субконфлюэнтного монослоя вокруг нее через 96 часов после переноса (ув.объектив 10х окуляр 10х).

Результаты морфометрического метода исследования

Исходя из полученных данных, следует, что после формирования дефекта суставного хряща, без замещения его БМКП, возможно его частичное восстановление. Вероятно, оно происходит за счет элементов костного мозга субхондральной зоны и зон суставного хряща, граничащих с областью дефекта, однако этих ресурсов недостаточно для восстановления утраченного объема хрящевой ткани. Через 6 месяцев наблюдений в контрольной группе отмечено частичное восстановление области дефекта, КВ составил 0,62±0,06. В группе Опыт 1 («Ch-G»+СККМ) КВ был равным 0,79±0,07, в группе Опыт 2 («Остеопласт»+СККМ) КВ находился на уровне 0,88±0,02 (P<0,03 с учетом множественных сравнений).

Сравнивая результаты морфометрического исследования на протяжении всего эксперимента, наблюдается раннее начало репаративных процессов в опытных группах при замещении сформированного дефекта биомедицинскими клеточными продуктами, однако более высокие показатели отмечаются в группе Опыт 2 (Рис.6).

Рис. 6. КВ в динамике на протяжении эксперимента.



Наивысшие показатели коэффициента восстановления в группе Опыт 2 на сроке наблюдения 6 месяцев свидетельствуют о более полном замещении сформированного в эксперименте дефекта суставного хряща по сравнению с Контрольной группой и группой Опыт 1.

Статистическая оценка результатов эксперимента

Через 6 месяцев наблюдений в каждом исследуемом срезе контрольной группы КВ был менее 0,85, исход восстановления ограниченных повреждений суставного хряща расценивался как неблагоприятный. В группе Опыт 1 количество случаев с неблагоприятным исходом было равным 14, группе Опыт 2 - 1 случай (Таблица 5).

Таблица 5 - Количество случаев с неблагоприятным исходом через 6 месяцев наблюдений в опытных группах

Исследуемые срезы	Неблагоприятный исход (КВ менее 0,85)		
	Есть	Нет	Всего
Опыт 1	14	16	30
Опыт 2	1	29	30
Всего	15	45	60

С помощью статистического метода проведена сравнительная оценка эффективности применения биомедицинских клеточных продуктов, используемых в эксперименте (Таблица 6).

Таблица 6 - Показатели оценки результатов восстановления ограниченных дефектов суставного хряща в опытных группах через 6 месяцев наблюдений

Группы сравнения	Показатели							
	ЧНИЛ2, %	ЧНИЛ1, %	СОР,% 95%ДИ	САР,% 95%ДИ	ЧБНЛ 95%ДИ	ОШ 95%ДИ	X^2 (Yets)	P
Опыт 1 и Опыт 2	3,3	46,7	92,9 [13,0-66,3]	43,3 [24,4-62,3]	2,3 [1,6-4,1]	0,04 [0,001-0,33]	12,80	0,0003

Таким образом, данные таблицы 6 свидетельствуют о том, что применение БМКП, используемого в группе Опыт 2, позволяет снизить относительный риск наступления неблагоприятных исходов лечения на 92,9 %, абсолютный риск - на 43,3% по сравнению с группой Опыт 1.

Анализ данных гистоморфологического метода исследования

Анализируя результаты гистоморфологического метода, необходимо отметить, что при исследовании области дефекта суставного хряща на сроке наблюдения 3 месяца в обеих опытных группах отмечались более выраженные репаративные процессы, которые сопровождались заметной активацией хондрогенеза и формированием хрящеподобной ткани с наличием крупных хондроцитов, в то время как в контрольной группе животных элементы ткани гиалинового хряща были представлены мелкими островками, преимущественно с краевым их расположениям относительно центральной зоны дефекта (Рис. 7а,б).

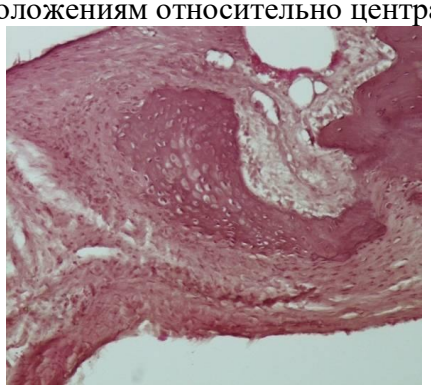
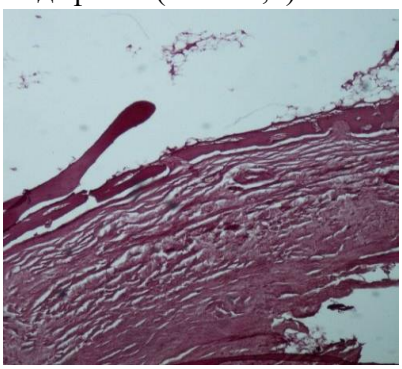
а  б 

Рис.7а,б. Центральная часть дефекта. Окраска гематоксилин - эозин. ув.20.

В группе животных, где дефект замещался БМКП СККМ+«Chondro Gide» через 3 месяца наблюдения в центральной зоне дефекта отмечалось формирование гиалиноподобной хрящевой ткани с большим количеством клеток типа хондробластов с крупными округлыми ядрами.

Часть области дефекта была выполнена грубогубчатой костной тканью. Субхондральная костная пластинка, как в контрольной группе, так и в обеих опытных группах была не восстановлена (Рис.8а, б).

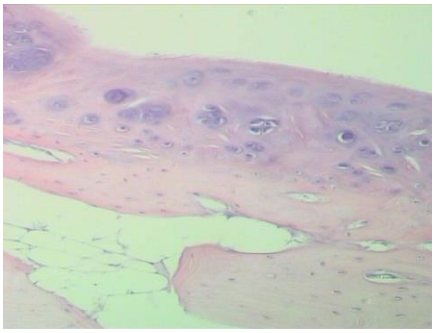
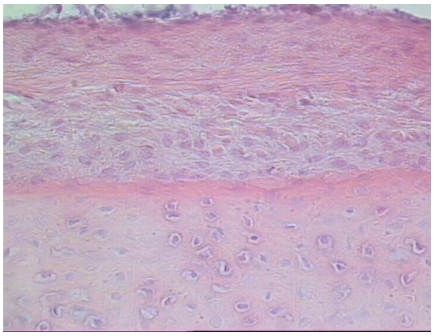
а  б 

Рис. 8 а,б. Зона дефекта с формирующейся хрящевой пластинкой. Окраска гематоксилин - эозин. а - увеличение 200; б - увеличение 400.

Морфологическое исследование животных опытной группы с БМКП СККМ+«Остеопласт» через 3 месяца наблюдения показало присутствие в центральной зоне дефекта широкого слоя хрящевых клеток с наличием заметного количества хондробластов. Со стороны костно-мозгового пространства происходило формирование молодых костных балок с образованием грубо-губчатой костной ткани (Рис.9а, б).

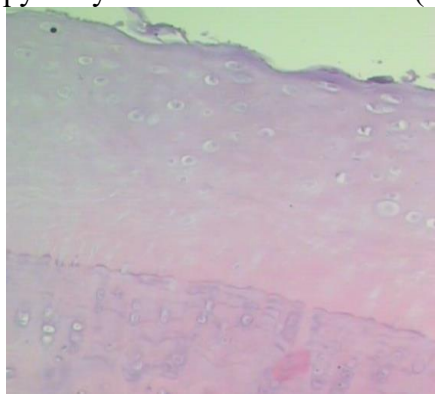
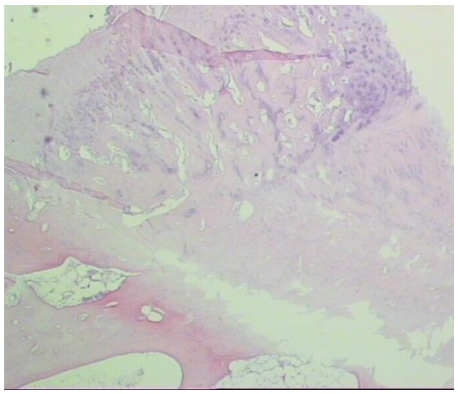
а  б 

Рис. 9а. Восстановление дефекта в виде появления гиалиноподобной хрящевой ткани с крупными клетками, формирующими изогенные группы. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 200.

Рис. 9б. Зона дефекта. Вновь сформированная губчатая костная ткань с участками обызвествляющейся хрящевой ткани. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 100.

К 6 месяцам в контрольной группе элементы ткани гиалинового хряща были представлены мелкими островками, преимущественно с краевым их расположением относительно центральной зоны дефекта. Наличия широкого слоя клеток не отмечено (Рис. 10а). Глубже хрящевой пластинки зона предсуществовавшего дефекта выполнена интенсивно окрашенными петлистыми структурами из хорошо интегрированных утолщенных костных балок с крупноядерными остеоцитами-остеобластами с широкими лакунами с большим количеством линий склеивания. В отдельных участках балчатых структур сохранились мелкие островки энхондрального остеогенеза. Субхондральная костная пластинка не сформирована (Рис. 10б).

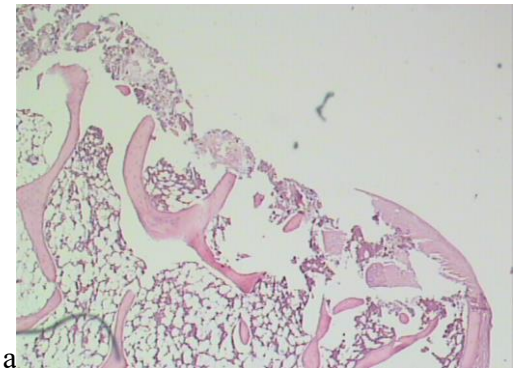
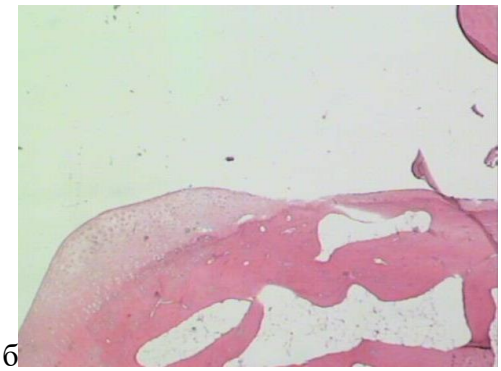
а  б 

Рис. 10а. Центральная зона дефекта. Окраска гематоксилин - эозин. ув.50.

Рис. 10б. Край дефекта. Участки энхондрального остеогенеза. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 50.

На сроке 6 месяцев наблюдения в группе животных, которым в качестве каркаса - носителя в составе БМКП применялся «Chondro Gide» края дефекта выполнены фокусами сформированного гиалинового хряща и подлежащей костной пластинкой. Сформированная зона дефекта представлена участками неравномерной плотности костной ткани, а также участками вновь сформированного гиалинового хряща с включениями ткани волокнистого хряща. Клетки расположены по-прежнему хаотично (Рис.11а). Поверхность формирующегося хряща покрыта надхрящницей, край неровный. Костные структуры в отдельных участках выполняют зону существующего хряща. До уровня интактного гиалинового хряща восстановления не произошло. Субхондральная костная пластинка не сформирована (Рис. 11б).

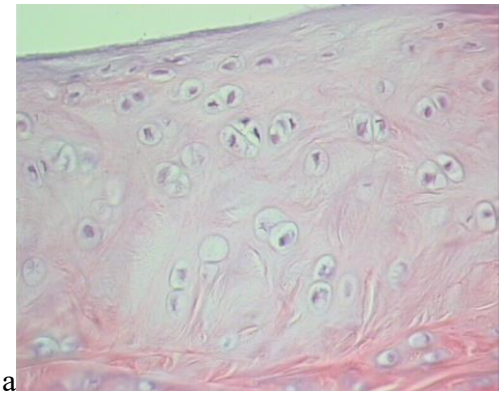
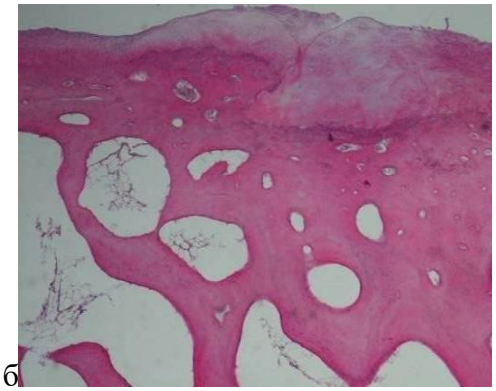
а  б 

Рис. 11а. Гиалиновый хрящ с хаотично расположенными двуядерными хондроцитами. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 100.

Рис. 11б. Формирование гиалинового хряща. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 400.

В группе животных с БМКП на основе матрицы «Остеопласт» к 6 месяцам центральная зона дефекта представлена широким слоем хрящевой ткани, имеющего структуру близкую к строению гиалинового хряща с тенденцией к формированию зонального строения, равномерным распределением хрящевых клеток, формирующих мелкие гнезда по 3-4 клетки. Также встречалось большое количество крупных хондроцитов с одним или двумя гиперхромными ядрами (Рис. 12а). На некоторых участках сформированной хрящевой пластинки имелись включения плотной волокнистой соединительной ткани, формирующей надхрящницу (Рис. 12б).

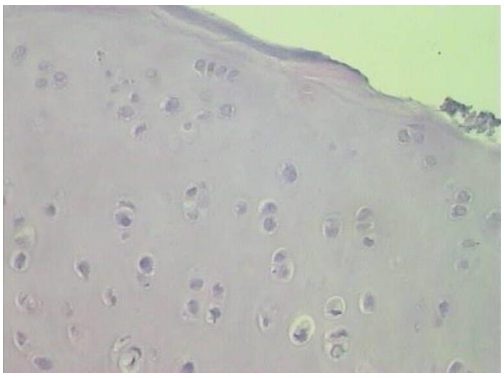
а  б

Рис. 12а. Вновь сформированный гиалиновый хрящ в зоне бывшего дефекта. Окраска гематоксилин – эозин. увеличение 400.

Рис. 12б. Участок новообразованной хрящевой ткани с тонкой полоской надхрящницы. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 200.

Вновь образованный хрящ незначительно уступал по толщине и структурной организации предсуществующей хрящевой ткани. Субхондральная костная пластинка имела тенденцию к полному восстановлению (Рис.13).

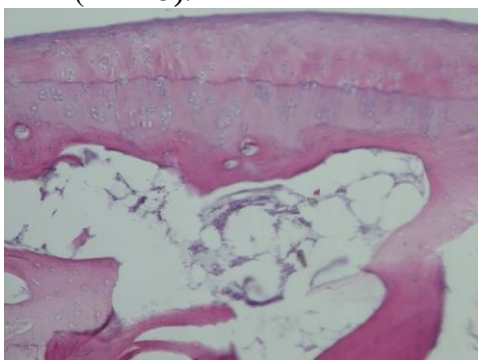


Рис. 13. Участок вновь образованного гиалинового хряща с формированием субхондральной костной пластинки. Окраска гематоксилин - эозин. увеличение 200.

ВЫВОДЫ

1. Остеоперфоративные способы хондропластики при лечении пациентов с ограничными дефектами суставного хряща коленного сустава наиболее эффективны при площади дефекта ≤ 2 $см^2$ ($p<0,05$).

2. Коллагеновые матрицы «Chondro Gide» и «Остеопласт» не являются цитотоксичными и могут использоваться в составе биомедицинских клеточных продуктов. Структура БМКП, созданного на основе матрицы «Остеопласт», обладает высокой пористостью с большим содержанием прикрепленных клеток, характеризуется высокой адгезивной способностью. При переносе в новый культуральный сосуд клетки мигрируют с поверхности матрицы и активно размножаются.

3. После формирования в эксперименте локального полнослойного повреждения суставного хряща без замещения его хондропластическими материалами возможно частичное восполнение преимущественно волокнистой хрящевой тканью (КВ=0,62±0,06). При использовании БМКП на основе матрицы «Chondro Gide» во вновь образованном гиалиновом хряще не отмечалось адекватного замещения структуры с обозначением зональной организации (КВ=0,79±0,07). Результатом имплантации разработанного БМКП, состоящего из аллогенных стромальных клеток костного мозга, выращенных на проницаемой коллагеновой матрице «Остеопласт», являлось формирование хрящевой гиалиновой ткани с анатомическими и гистотопографическими характеристиками близкими к интактному суставному хрящу (КВ=0,88±0,02) ($p<0,03$ с учетом множественных сравнений).

4. Применение биомедицинского клеточного продукта на основе матрицы «Остеопласт» позволяет достичь КВ=0,88±0,02 (снижение относительного риска наступления неблагоприятных исходов на 92,9 %, абсолютного риска - на 43,3% по сравнению БМКП, изготовленным с помощью мембраны «Chondro Gide»).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При выборе способа хондропластики ограниченных дефектов суставного хряща необходимо оценивать площадь и локализацию повреждения, степень хондромаляции смежного отдела сустава, а также возраст пациента.

Обязательным условием для предоперационного планирования является проведение МРТ, которая позволяет визуализировать дефект суставного хряща, оценить его локализацию и глубину.

Для восстановлении суставного хряща при локальных дефектах площадью более 2 $см^2$ следует использовать способы хондропластики, основанные на трансплантации костно-хрящевых блоков, применении покровных матриц или биомедицинских клеточных продуктов. Остеоперфоративные методы хондропластики малоэффективны.

Для создания равных условий при изучении особенностей хондропластики в эксперименте необходимо использовать специализированный инструмент, позволяющий сформировать одинаковые цилиндрические дефекты суставной поверхности у всех животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Восстановление ограниченных дефектов суставного хряща с помощью клеточно-инженерных конструкций / С.А. Герасимов [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2017. - Т. 19, № 4. - С. 97-103.

2. Хирургическое лечение ограниченных повреждений суставной поверхности: современное состояние вопроса / С.А. Герасимов [и др.] // Политравма. – 2016 - № 1. - С. 63-69.

3. Корригирующие остеотомии в лечении / А.А.Зыкин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. - С. 288

4. Нерешённые вопросы регенерации хрящевой и костной ткани / М.Ю. Ежов [и др.] // Успехи современного естествознания. - 2015. - № 5. - С. 126-131.

5. Применение мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток для стимуляции регенерации суставного хряща / М.Ю. Ежов [и др.] // Современная наука. - №3. – 2019. – С. 156-162.

6. Нормализация биологической оси нижних конечностей путем выполнения корригирующих остеотомий: X юбилейный всероссийский съезд травматологов-ортопедов (Москва, 16-19 сентября 2014г.) − Москва, 2014. − С. 225.

7. Остеоперфоративные методики хондропластики локальных дефектов суставного хряща и их место в современной медицине: Материалы X Юбилейного всероссийского съезда травматологов-ортопедов. СПб.: Человек и его здоровье, 2014. − С. 213.

8. Использование клеточно-инженерных конструкций для восстановления локальных повреждений суставного хряща в эксперименте / С. А. Герасимов [и др.] // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии. − 2017. − С. 130-133.

9. Герасимов, С.А. Наш опыт лечения локальных дефектов гиалинового хряща коленного сустава / С.А.Герасимов, А.А.Зыкин // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Приоровские чтения», Москва, 21-22 ноября 2013. − М., 2013.− С. 34-36.

10. Зыкин, А.А. Результаты лечения гонартроза 2-3 стадии с применением корригирующих остеотомий / А.А.Зыкин, С.А.Герасимов // Сборник тезисов Всероссийской

научно-практической конференции молодых ученых «Приоровские чтения», Москва, 21-22 ноября 2013. − М., 2013. − С. 63-65.

ПАТЕНТЫ

1. Патент РФ «Устройство для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности» №164921.