

+

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Приволжский исследовательский медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

На правах рукописи

Герасимов Сергей Александрович

**Восстановление суставного хряща при локальных дефектах
(клинико-экспериментальное исследование)**

14.01.15 – травматология и ортопедия.
Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук Н.А. Тенилин

г. Нижний Новгород
2019

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	4
Введение.....	5
Глава 1. Современное состояние вопроса о хондропластике локальных дефектов суставного хряща (обзор литературы).	11
1.1. Особенности гистоархитектоники и репарации повреждений гиалинового суставного хряща.	11
1.2. Обзор способов восстановления ограниченных повреждений суставного хряща	12
Глава 2. Материалы и методы.....	27
2.1 Материалы и методы клинического этапа исследований.	28
2.2.1 Характеристика матриц – носителей, используемых в составе бмкп. ...	35
2.2.2 Эксперимент <i>in vitro</i>	36
2.2.3 Эксперимент <i>in vivo</i>	40
2.2.4 Морфологическое исследование биоптатов.....	46
2.2.4.1 Гистоморфологический метод.....	46
2.2.4.2. Морфометрический метод	47
2.2.5. Методика статистической оценки результатов.....	49
Глава 3. Результаты хирургического лечения пациентов с ограниченными дефектами суставного хряща.	51
Глава 4. Результаты экспериментальных исследований.....	58
4.1. Анализ цитотоксичности и адгезивных свойств используемых матриц-носителей.	58
4.2. Макроскопическая оценка биопсийного материала.....	68
4.3. Анализ данных морфометрического метода исследования.....	72
4.5.1. Морфологическая характеристика ткани восстановленного дефекта суставного хряща без замещения бмкп. 3 месяца после операции.....	77

4.5.2. Морфологическая характеристика ткани восстановленного дефекта суставного хряща без замещения бмкп. 6 месяцев после операции.....	80
4.5.3. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью бмкп сккм + «chondro gide». 3 месяца после операции.	83
4.5.4. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью бмкп сккм + «chondro gide». 6 месяцев после операции.	86
4.5.5. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью бмкп сккм + «остеопласт». 3 месяца после операции.	93
4.5.6. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью бмкп сккм + «остеопласт». 6 месяцев после операции.....	96
Заключение	102
Выводы:	117
Практические рекомендации	119
Список литературы	120
Приложения.	142

Список сокращений

СККМ – стромальные клетки костного мозга

KB – коэффициент восстановления

МРТ – магнитно-резонансная томография

УЗИ – ультразвуковое исследование

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ФТЛ – физиотерапевтическое лечение

ЛФК – лечебная физическая культура

ОХАТ – остеохондральная аутотрансплантация

БМКП – биомедицинский клеточный продукт

hd – высота восстановленной ткани в области дефекта

hk – высота восстановленной ткани в области краев дефекта

KB – коэффициент восстановления

САР – снижение абсолютного риска

СОР – снижение относительного риска

ЧБНЛ – число больных, которых необходимо лечить каждым исследуемым способом для предотвращения неблагоприятного исхода у одного больного

ОШ – отношение шансов

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

НК клетки – гранулярные лимфоциты, естественные (натуральные) киллеры

HLA-I, HLA-II- человеческие лейкоцитарные антигены

Ch-G – матрица Chondro Gide

Введение

С развитием контактных видов спорта, ростом дорожного и бытового травматизма увеличивается число повреждений суставной поверхности. Наиболее уязвимыми являются крупные суставы: коленный, плечевой, тазобедренный, голеностопный (Корнилов Н.В., 2005; Fraitzl C.R., 2008, Колесников М.А., 2012; Filardo G., 2013). Несмотря на динамичное развитие современных методов диагностики, до сих пор сложно представить истинную распространенность повреждений суставного хряща (Корнилов, Н.Н., 2005; Johnstone B., 2013; Richer D.L. 2016). Ding C. с соавторами при оценке МРТ пациентов с повреждениями области коленного сустава выявили распространенность дефектов хряща, достигающую 31% у лиц в возрасте от 45 до 54 лет (Ding C, 2005). В другом исследовании с применением томографа 3.0 Тесла у 9 из 20 случайно выбранных испытуемых в возрасте 25-45 не имеющих жалоб выявлены повреждения суставного хряща коленного сустава (Stahl R., 2009). Ряд авторов сообщают о 11% клинически значимых повреждений суставного хряща III и IV ст по классификации Outerbridge (Outerbridge R., 1961) среди 993 пациентов, которым были выполнены артроскопические вмешательства по различным показаниям (Aroen A., 2004). В исследовании, проведенном на 31 516 прооперированных пациентах, повреждения суставного хряща были выявлены в 63 %, причем 5 % повреждений IV ст обнаружены у пациентов моложе 40 лет (Curl W.W., 1997). Hjelle K. С соавторами сообщают о 61% повреждений суставного хряща, среди которых 19 % носят ограниченный характер (Hjelle K., 2002).

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 (Шапиро К.И., 1991; Kirkley A., 2008, Hunt H.E., 2014; Jordan M., 2016).

Существует много способов и алгоритмов лечения пациентов с ограниченными повреждениями суставного хряща. Несмотря на широкий спектр вариантов, от методов 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 (Негреева М.Б., 2014; Magnussen R.A., 2008; Vasiliadis H.S., 2010; Lim H.C., 2012; Zeng L., 2016).

Несвоевременное и неадекватное лечение локальных дефектов суставного хряща приводит к раннему развитию генерализованного артроза и инвалидизации пациента (Кудашев Д.С., 2008; Эйсмонт О. Л., 2008; Diekman V.O., 2010).

Цель исследования – обоснование необходимости и разработка в эксперименте биомедицинского клеточного продукта для восстановления суставного хряща при локальных дефектах.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

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:

Впервые показано, что применение остеоперфоративных способов хондропластики ограниченных повреждений суставного хряща коленного сустава наиболее целесообразно при площади дефекта не более 2 см².

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 БМКП на основе коллагеновой матрицы «Остеопласт» приводит к формированию хрящевой гиалиновой ткани с анатомическими и гистотопографическими характеристиками близкими к интактному суставному хрящу.

Практическая значимость работы

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.

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 проницаемой 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».

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.

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.

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 вивариумом. Инструментальные методы исследования экспериментальных образцов проводились совместно с сотрудниками группы патологической анатомии и консервации тканей. Автор владеет всеми описанными техниками оперативных вмешательств.

Публикации по теме диссертационного исследования

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

Структура и объём и работы

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

Объект исследования

В клинической части исследования проведен проспективный анализ результатов лечения 52 пациентов, оперированных на базе ортопедического отделения взрослых ННИИТО (ПФМИЦ) в период с 2011 по 2015 годы. Нозология включает в себя следующие диагнозы по МКБ-10: M17.0 – первичный гонартроз двусторонний; M17.3 – посттравматический гонартроз; M 23.8 – другие внутренние поражения колена; S83 – повреждение капсульно-связочного аппарата коленного сустава; M23.2 – повреждение мениска в результате старого разрыва или травмы.

Экспериментальную часть работы выполнена на 23 кроликах породы «Серый великан» (41 оперированный сустав), которым в эксперименте проводили восстановление сформированного цилиндрического дефекта суставного хряща внутреннего мыщелка бедренной.

ГЛАВА 1. Современное состояние вопроса о хондропластике локальных дефектов суставного хряща (обзор литературы).

1.1. Особенности гистоархитектоники и репарации повреждений гиалинового суставного хряща.

Гиалиновый хрящ представляет собой высокоспециализированную ткань с относительно малым количеством клеток, погруженных во внеклеточный матрикс. Матрикс состоит в основном из волокон коллагена и протеогликанов. Клеточный состав определен только одним видом клеток – хондроцитами, которые занимают около 1-2 % от общего объема хряща, сами способны продуцировать внеклеточный матрикс, но не способны к делению (Павлова В.Н., 1988; Омеляненко Н.П., 2011; Veserra J, 2010). В суставном хряще довольно четко дифференцируются 4 зоны, каждая из которых имеет особенности направления коллагеновых волокон, а также различную форму, размер и упорядоченность клеток. Так, в первой – поверхностной зоне пучки коллагеновых волокон направлены тангенциально, хондроциты мелкие уплощенные и ориентированы вдоль поверхности. Зона также характеризуется большей плотностью клеток, которые секретируют белок поверхностной зоны – лубрицин. Вторая зона – промежуточная или переходная, характеризуется наличием косых, пересекающихся волокон, в которых беспорядочно и неравномерно распределены более крупные и округлые хондроциты, продуцирующие коллаген II типа и протеогликан агрекан. В третьей зоне клетки еще более крупные и ориентированы в колонны перпендикулярно к поверхности, коллагеновые волокна имеют преимущественно радиальное направление. Особенностью четвертой зоны является сильно минерализованный матрикс. Внеклеточный матрикс обладает высокой гидратацией (до 70-80%), причем вода может легко входить и выходить из хряща, способствуя транспортировке газов и метаболитов (Павлова В.Н., 1988; Омеляненко Н.П., 2011; Veserra J, 2010).

Матрикс образован двумя классами молекул: фибриллярными белками, представленными преимущественно коллагеном II типа и полисахаридными цепями гликозамингликанов, которые ковалентно связаны с белками, в виде протеогликанов (Modis L. 1983). Протеогликаны очень гидрофильны и, привлекая большее количество воды, обеспечивают устойчивость к компрессии, тогда как волокна коллагена препятствуют набуханию хрящевой ткани и придают ей высокую прочность на разрыв. Таким образом, сбалансированное состояние двух составляющих внеклеточного матрикса способствует распределению локальной нагрузки на всю поверхность суставного хряща (Омельяненко Н.П., 2011)

Гиалиновый хрящ не имеет кровеносных и лимфатических сосудов, нервных окончаний, трофика ткани осуществляется посредством диффузии из синовиальной жидкости и подлежащей субхондральной кости. Метаболизм хондроцитов преимущественно анаэробный, гликолитический (Павлова В.Н., 1979).

В ответ на повреждение хряща начинается усиление метаболической активности клеток и обмена матрикса, но из-за особенностей архитектоники ткани восстановление повреждения ограничено, вследствие невозможности миграции хондроцитов к месту дефекта. Так, в результате репаративного процесса в области полнослойного повреждения формируется волокнистый хрящ, значительно уступающий по своим свойствам гиалиновой хрящевой ткани (Лаврищева Г.И. 1996; Омельяненко Н.П., 2011).

1.2. Обзор способов восстановления ограниченных повреждений суставного хряща

Восстановление ограниченных дефектов гиалинового хряща суставной поверхности является актуальной проблемой современной медицины. Даже небольшие по площади дефекты суставного хряща рассматриваются хирургами как серьезные повреждения, способные в дальнейшем привести к

развитию артроза и выраженному нарушению функции сустава (Куляба Т.А., 2007; Миронов С.П., 2010; Aaron R.K., 2006; Batty L., 2011).

Для определения степени повреждения суставного хряща наиболее часто используется классификация Outerbridge, 1961 (Outerbridge R., 1961), которая отражает глубину и площадь разрушения суставного хряща. Повреждения I и II степени не имеют клинических проявлений и не требуют хирургического лечения, тогда как III, IV степени, являясь глубокими поражениями, часто приводящими к быстрому прогрессированию артроза, требуют применения известных способов хондропластики или подталкивают исследователей на разработку новых методик (Корнилов Н.Н., 2005; Королев А.В., 2008).

Описано много различных способов хирургического лечения ограниченных повреждений суставного хряща, и выбор способа для конкретного пациента зависит от локализации, глубины, площади повреждения, давности травмы, состояния хряща смежной суставной поверхности, возраста (Zanasi S., 2006; Vecerra J., 2010; Benthien J.P. 2011). Основные методики, применяемые для хондропластики дефектов хряща, можно классифицировать по группам:

1. Остеоперфоративные методики стимуляции хондрогенеза: абразивная хондропластика, туннелизация, микрофрактуринг.
2. Замещение дефектов структурными ауто-, аллотрансплантатами: Мозаичная хондропластика (остеохондральная аутооттрансплантация), аллоштифт, аллографт.
3. Методики с использованием различных матриц-носителей и клеточных технологий: имплантация аутологичных, аллогенных хондроцитов; индуцированный на матрице аутохондрогенез; имплантация аутологичных, аллогенных стромальных клеток костного мозга (СККМ), клеток-предшественников других тканей.

4. Различные комбинации методов: туннелизация + имплантация СККМ, мозаичная хондропластика + имплантация хондроцитов и др.

Показанием к остеоперфоративным способам хондропластики является локальная деструкция хрящевой ткани, распространяющаяся до субхондральной кости (IV ст. по Outerbridge, 1961г.), на площади 2-4 см² у пациентов, возраст которых не превышает 60 лет (Steadman J.R., 2006; Spahn, G., 2008; Asik M., 2008; Spahn G., 2008). В основе всех этих методик лежит идея нарушения целостности кости для того, чтобы элементы костного мозга получили доступ из глубины губчатого слоя кости на поверхность дефекта (Dandy D.J., 1987; Insall J.N., 1984; Mirza M.Z., 2015).

Абразивная хондропластика была предложена и обоснована P.V. Magnuson в 1941 г., а в 1979 г. R.P. Ficat описал артроскопическую технику этой методики (Ficat R.P., 1979), суть которой заключалась в обширном удалении субхондральной кортикальной кости до спонгиозного слоя на глубину 1-3 мм до обнажения внутрикостных сосудов и появления геморрагического экссудата. При этом края дефекта в пределах здорового хряща обрабатывались перпендикулярно к подлежащей кости, в результате чего дефект имел вид чаши, в которой создавались оптимальные условия для удержания элементов крови, костного мозга в области повреждения (McCarroll J.R., 1983). Недостатком метода является развитие гемартроза в раннем послеоперационном периоде, вследствие создания обширной кровоточащей поверхности в области дна дефекта (Стадников А. А., 2008; Dandy D.J., 1987; Al-Omran A.S., 2009).

В 1959 г. K.H. Pridie предложил способ туннелизации (Pirdie A. H., 1959). Этот метод основан на рассверливании дна хрящевого дефекта сверлом диаметром около 6 мм с тем же расстоянием между отверстиями. На сегодняшний день глубокое, многократное рассверливание дна дефекта осуществляется с помощью спицы Киршнера или сверлом диаметром 1,5-3,5

мм. Однако некоторые авторы указывают на термическое повреждение субхондральной пластинки при рассверливании, что может негативно сказываться на результатах лечения (Макушин В.Д., 2006, Kirkley A., 2008; Magnussen R.A., 2008; Henrotin Y., 2009)

Существует несколько модификации этого метода, при которых субхондральная спицевая туннелизация бедренной кости выполняется ретроградно или из не нагружаемых участков суставных поверхностей, расположенных в межмышечковой ямке параллельно обнаруженным зонам хондромалиции (Новиков В.В., 2003; Макушин В.Д., 2006; Шевцов В.И., 2010; Steinwachs M.R., 2008).

Микрофрактуринг как метод лечения ограниченных хрящевых дефектов суставной поверхности был описан в 1994 г. J.R. Steadmann (Steadman J.R., 2006). Он предложил использование специального шила-перфоратора, с помощью которого в дефекте хряща производятся микропереломы субхондральной кости. При этом отсутствовал негативный эффект нагревания и ожога костной пластинки при рассверливании (Mithoefer K., 2009). В среднем на 1 см² выполняется 3-4 отверстия глубиной около 4 мм. Артроскопические шила-перфораторы имеют метки глубины, а также различный угол наклона рабочей части: 0°, 30° или 60° от их продольной оси, позволяющий выполнить остеоперфорацию в труднодоступных отделах сустава (Кузнецов И.А., 2003; Steadman J.R., 2006; Vies-Tuck M.L., 2008). Отрицательным моментом методики является утолщение субхондральной костной пластинки после формирования в ней микропереломов, что со временем значительно ухудшало трофику формируемого регенерата (Маланин Д.А., 2010; Mithoefer K., 2009; Jordan M. 2016).

Подводя итог анализа группы остеоперфоративных методик стимуляции хондрогенеза нужно отметить, что часто они применяются в составе алгоритма лечения пациентов с локальными хрящевыми дефектами и

являются способами выбора при первом хирургическом вмешательстве (Негреева М.Б., 2014; Cain E.L., 2007; Lim H.C., 2012). Широкому распространению описанных техник хондропластики способствовали простота выполнения, минимальный набор необходимого хирургического инструментария (Ларцев Ю.В., 2006; Орлецкий А.К., 2010; Insall J.N. 1984). Недостатками методов является слабая фиксация элементов крови, костного мозга, факторов роста в области дефекта на поверхности субхондральной кости, незащищенность во время осевой нагрузки и при движениях в суставе (Маланин Д.А., 2010; Tetteh E.S., 2012).

В результате использования остеоперфоративных методик в области дефекта образуется хрящевой регенерат, напоминающий фиброзный хрящ, который по своим биомеханическим характеристикам значительно уступает гиалиновому хрящу. Попытки восстановления дефектов хряща такими способами показывают хорошие результаты у 75% пациентов в течение 5 лет (Загородний Н.В., 2009; Zanasi S., 2006; Kirkley A., 2008). Многие авторы указывают на ухудшение результатов лечения с течением времени (Мионов С. П., 2008; Орлецкий А.К., 2010; Richer D.L., 2016).

Для достижения органспецифичного замещения изолированных дефектов суставной поверхности была предложена группа методов, основанных на трансплантации интактного суставного хряща с подлежащими костными блоками. Одной из наиболее широко распространенных таких техник является остеохондральная ауто трансплантация (ОХАТ, мозаичная хондропластика) (Zeng L. 2016). Результаты клинической апробации ОХАТ были описаны Н. Wagner еще в 1964 г (Эйсмонт О. Л., 2008), затем технология претерпела изменения, был разработан артроскопический инструмент для ее выполнения (Hangody L., 2001).

Идея остеохондральной ауто трансплантации (ОХАТ) заключается в сохранении жизнеспособности хондроцитов интактного хряща, трансплантируемого вместе с подлежащей костной тканью (Giuseppe F.,

2015). Данная методика подразумевает пересадку костно-хрящевого трансплантата из не нагружаемых отделов сустава в область дефекта суставного хряща, при этом донорскими зонами чаще являются переднелатеральные отделы мыщелка бедра и его межмышцелковая зона (Vobic V., 1996). Операция может быть выполнена полностью артроскопически или из мини доступов. При этом возраст пациентов не должен превышать 45 лет (Minas T., 2014). Исходом операции является заполнение дефекта гиалиновым хрящом с участками фиброзно-хрящевой ткани по периферии цилиндров (Королев А.В., 2010; Котельников Г.П., 2014). Остается дискуссионным вопрос о размере и количестве трансплантируемых цилиндров. Однако большинство авторов сходятся во мнении, что оптимальным для ОХАТ является трансплантация блоков диаметром 7 мм в количестве 3-4 штук (Тихилов Р.М., 2010; Thaunat M., 2007). Таким образом, мозаичная хондропластика наиболее эффективна у молодых пациентов с ограниченным дефектом суставной поверхности площадью 2-4 см² (Королев А.В., 2009; Брянская А.И., 2010). По данным авторов, среднесрочные отличные и хорошие результаты применения ОХАТ отмечены более чем в 80% случаев (Куляба Т.А., 2007; Giuseppe F., 2015). Несмотря на привлекательность данного метода, его применение весьма ограничено малой площадью донорских зон сустава, а также нанесением дополнительной травмы ткани суставной поверхности во время забора трансплантатов (Котельников Г.П., 2014; Berlet G.C., 1999; Mithoefer K., 2009).

Проблема ограниченности и болезненности донорских зон решалась применением различных способов трансплантации ортотопических костно-хрящевых аллоблоков идентичных размеров или аналогичных ОХАТ (Newman A.P., 1998; Bugbee W.D., 1999; Gross A.E., 2002; Sherman S.L., 2014). Однако из-за плохих результатов интеграции трансплантата больших размеров, а также потенциальной возможности трансмиссии вирусов

гепатита С и В или ВИЧ-инфекции данный способ не получил широкого распространения (Friendlander G.E., 1983; Beaver R.J., 1992; Bugbee W.D., 2006; Kim H.T., 2008).

Ограниченность в выборе метода хондропластики обширных дефектов суставной поверхности площадью более 4 см² способствовала разработке способов, основанных на применении клеточного материала.

Работы в этом направлении велись с 60-х годов 20 века, однако первые данные о лечении пациентов с посттравматическими дефектами суставной поверхности путем аутотрансплантации хондроцитов (АТХ) были опубликованы только в 1994 г. М. Brittberg производил трансплантацию культуры аутологичных хондроцитов под лоскут надкостницы, подшитой по краю обработанного дефекта суставной поверхности (Brittberg M., 1994). При этом на первом этапе во время диагностической артроскопии осуществлялся забор фрагмента интактного суставного хряща из ненагружаемой зоны, выделение хондроцитов с последующим культивированием в лаборатории в течение 3 недель (Brittberg M., 1994).

Показанием к применению АТХ стало наличие полнослойного хрящевого дефекта нагружаемой поверхности у молодых пациентов на площади от 3-4 до 16 см² (Миронов С.П., 2008; Brittberg M., 2010; Harris J.D., 2010). После первых публикаций методика казалась настоящим прорывом в области лечения обширных дефектов хряща. Однако наличие осложнений, вызванных периостальной гипертрофией, возникающей в 25-42% случаев после имплантации надкостницы в качестве покровной мембраны, приводило к необходимости выполнения ревизионных вмешательств (Hvid I., 1981; Harris J.D., 2011; Cole B.J., 2012).

После неудачного опыта применения надкостницы в качестве покровного материала для направленной регенерации хряща и выявления негативных последствий ее имплантации, начались разработки и внедрение в практику матриц, которые осуществляли механическую защиту регенерата

во время осевых и тангенциальных нагрузок, а также должны были способствовать поддержанию фенотипа имплантированных клеток (Bachmann G., 2004; Safran M.R., 2008; Albrecht C., 2011). По данным ряда авторов, хондроциты, культивированные в монослое, после помещения в область дефекта теряют свой фенотип и способность продуцировать межклеточный матрикс и коллаген II типа (Модяев В.П., 1980; Gigande A., 2009; Gresco F., 2009). Трехмерная структура матриц-носителей способствует поддержанию фенотипа клеток (Marcacci M., 2005; Griffon D.J., 2006; Andrew C., 2014).

По своим физическим свойствам матрицы представлены в виде твердых сетчатых каркасов и гелей (Safran M.R., 2008; Stratton S., 2016). Твердые носители способствуют адгезии клеток и создают трехмерную структуру регенерата, тогда как гели, имея преимущества в технике имплантации, ограничивают метаболизм клеточной культуры (Andereya S., 2007; Кон Е., 2008). Высокая пористость является важным свойством для интеграции клеток в структуру матрицы и последующего метаболизма регенерата (Reinholz G.G., 2004; Safran M.R., 2008; Bauge C., 2015).

Главными требованиями к используемым материалам, входящим в состав носителей, являются их биосовместимость и резорбируемость за прогнозируемые интервалы времени без выделения токсичных молекул (Котельников Г.П., 2014; Behrens P., 2002; Safran M.R., 2008; Filardo G., 2013).

Исходя из основного вещества, матрицы можно разделить на 2 группы:

1. Матрицы на основе биологических веществ: коллаген, фибрин, желатин (Hendrickson D.A., 1994; Sams A.E., 1995; Lee C.R., 2003), гиалуронан, хитозан, агароза и альгинат (Brittberg M., 1997; Rahfoth B., 1998; Solchaga L.A., 2002). В результате проведенных исследований было показано, что использование матриц – носителей (каркасов) поддерживает фенотип

хондроцитов, способствуют хондрогенной дифференцировке имплантируемых стромальных клеток (Griffon D.J., 2006; Pulkkinen H., 2006; Magalhaes J., 2015).

Основным преимуществом носителей на основе этих материалов являются низкие показатели токсичности и способности вызывать воспалительный ответ (Mierisch C.M., 2003; Chang C.H., 2004; Muller F.A., 2006).

2. Матрицы на основе синтетических веществ: полимолочная, полигликолиевая кислоты (и их сочетания) (Giurea A., 2003; Cohen S.B., 2003; Zwingmann J., 2007), гидроксиапатит, лавсан, тефлон (McGibbon B., 1977; Mola F., 2007). Экспериментальные и клинические исследования таких каркасов подтвердили эффективность при хондропластике ограниченных дефектов суставного хряща, синтетические матрицы проще в обращении, чем натуральные материалы, могут взаимодействовать с тканями организма (Defrere J., 1992; Pan Y., 2008).

Покровные мембраны, пришедшие на замену периостальному лоскуту, стали использоваться в сочетании с остеоперфоративными методиками хондропластики (Мушин Д.В., 2014; Блоков М., 2014; Basad E., 2010). Они удерживали регенерат в области сформированного ложа, выполняли функцию его механической защиты, что способствовало более полному замещению дефекта фиброзно-хрящевой тканью. Такие техники описаны под названием индуцированный на матрице аутохондрогенез (AMIC) (Marcacci M., 2005; Pascarella A., 2010; Filardo G., 2013; Gille J., 2013).

Большое распространение матрицы-носители получили в сочетании с аутотрансплантацией хондроцитов. В 1998 г. группа исследователей во главе с P. Behrens выполнила первую трансплантацию аутологичных хондроцитов, культивированных на двухслойной матрице, состоящей из свиного коллагена I и III типов (Behrens P., 2002). Методика предполагала двухэтапное хирургическое вмешательство, на первом этапе которого осуществлялся

забор необходимого объема хряща из не нагружаемой зоны сустава с последующим культивированием хондроцитов традиционным образом в монослойной среде в течение 3-4 недель до получения 15-20 млн клеток. Затем матрица засеивалась хондроцитами и культивировалась в аутосыворотке в течение еще 3 дней, в результате чего формировался трехмерный регенерат с равномерным распределением клеток на всей площади носителя, который имплантировался в область обработанного дефекта во время второго этапа (Загородний Н.В., 2010; Haddo O., 2004; Maus U., 2008; Jacobi M., 2011). По сообщениям авторов, хорошие результаты лечения данным способом наблюдались у 75% пациентов на сроке наблюдения до 10 лет (Котельников Г.П., 2010; Cole V.J., 2003; Bentley J., 2012). Однако некоторые авторы указывают на отсутствие значимой разницы отдаленных результатов лечения методами аутооттрансплантации хондроцитов и остеоперфорации, выполненных при равных условиях (Chow J.C., 2004; Bartlett W., 2005; Britberg M, 2010; Harris J.D., 2010; Vasiliadis H.S., 2010).

Низкая регенераторная способность хондроцитов выращенных в монослое или на матрице-носителе, привела к разработке нового способа культивирования – трехмерной агрегации аутологичных хондроцитов с образованием хондросфер, причем агрегация клеток происходит в растворе без физической или химической стимуляции (Wolf F., 2008). В результате двухнедельного культивирования хондроцитов образуются сферы 500-800 мкм, с числом клеток, вдвое превосходящим количество клеток в том же объеме нативного хрящевого матрикса. При имплантации в область повреждения хондроциты на поверхности хондросфер адгезируются к краям дефекта и сливаются друг с другом, что позволяет отказаться от средств дополнительной фиксации регенерата (Kirkley A. A., 2008). Недостатками метода являются высокая стоимость культивирования хондроцитов, необходимость двухэтапного вмешательства, а также нанесение травмы

здоровой хрящевой ткани при заборе материала для культивирования (Zanasi S., 2006; Richer D.L., 2016).

Многие авторы отмечают явление дедифференцировки хондроцитов после имплантации из благоприятных условий культуральной среды в область только что обработанного дефекта, в котором в течение последующих нескольких дней создаются «агрессивные» условия для жизни клеток. В связи с развитием асептического воспаления значительная часть имплантированных клеток погибает, многие другие теряют свой фенотип (Guilak F., 2004; Kon E., 2008; Caron M.M., 2012). Также отмечается плохое восстановление субхондральной кости при трансплантации хондроцитов, что может быть связано с ограничением регенераторных способностей зрелых клеток (Mierisch C.M., 2003; Magnussen R.A., 2008). Кроме того, пролиферативный потенциал хондроцитов уменьшается с возрастом, что значительно ограничивает применение способов имплантации хондроцитов у пациентов старших возрастных групп (Mikos A.G., 2003; Vasiliadis H.S., 2010; Giuseppe F., 2015).

В попытке усилить регенераторный потенциал трансплантата исследователи стали использовать клетки-предшественники, выделенные из других тканей (Ступина Т.А., 2010; Hunt Н.Е., 2014). Описаны методы хондропластики, в которых для регенерации суставного хряща используются клетки, полученные из жировой ткани (Тракуев Д.О., 2005; Тихилов Р.М., 2010). Простота забора и доступность объема материала для выделения необходимых клеток и дальнейшего культивирования во многом определяла выбор источника (Куляба Т.А., 2010; Baksh D., 2004). Доложено о положительных результатах имплантации клеток-предшественников, выделенных из синовиальной оболочки (Sakaguchi Y., 2005; Shirasawa S., 2006; Takahashi K., 2006). Также как и при имплантации аутохондроцитов, этот метод предполагал двухэтапное хирургическое вмешательство с забором фрагмента синовиальной оболочки во время лечебно-диагностической

артроскопии (Miyamoto A. , 2007; Diekman B.O., 2010). Ряд исследователей считают, что при создании оптимальных условий культуральной среды возможна направленная хондробластная дифференцировка этих клеток (Багаева В.В., 2014; Sekiye I., 2002), однако, после перемещения клеточной культуры в область хрящевого дефекта, «насильственно культивированные» клетки быстро теряют свой фенотип, а также способность продуцировать коллаген II типа и гиалинспецифические маркеры (Миронов С. П., 2008; Ochi M., 2006; Robinton D.A., 2012).

Перспективным направлением для восстановления ограниченных дефектов суставного хряща представляется использование стволовых клеток. Кровь из пуповины является богатым источником стволовых клеток (Broxmeyer H.E., 1989; Rosada C., 2003; Bevilacqua C., 2008) и может содержать плюрипотентные или мультипотентные стволовые клетки, которые при определенных условиях могут дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном или адипогенном направлениях (Хлопин Н.Г., 1946; Goodwin H.S., 2001; Rosada C., 2003; Liangliang X, 2014). Н. Yan с соавторами в эксперименте изучил возможности стволовых клеток пуповинной крови в регенерации суставного хряща кролика, в результате отмечено, что через 12 недель после имплантации только 40% суставных дефектов были восстановлены тонким слоем гиалиноподобного хряща, а 60% были замещены фиброзной тканью (Yan H., 2007).

Наиболее целесообразным для восстановления хрящевых или костно-хрящевых дефектов суставной поверхности представляется использование стромальных клеткок костного мозга (СККМ) (Castro-Malaspina H., 1980; Wakitani S., 1994; Mikos A.G., 2006; Johnstone B., 2013). По сравнению с хондроцитами, СККМ обладают большей регенераторной активностью (Pittenger M.F., 1999; Barry F., 2001; Hwang N.S., 2007). Благодаря свойствами полипотентности, под воздействием микроокружения зоны хрящевого

дефекта они способны дифференцироваться в направлении хондробластов и остеобластов, что дает возможность восстановления суставного хряща и субхондральной кости. (Bianco P., 2000; Grande D.A., 1995; Dennis J.E., 1999; Baksh D., 2004; Dominici M., 2006; Hwang N.S., 2007). Особую ценность методике придает возможность использования аллогенных стромальных клеток костного мозга, что, при относительно недорогой процедуре культивирования, позволяет выполнить одноэтапное замещение дефекта суставного хряща биомедицинским клеточным продуктом (Caplan A.I., 2001; Uematsu K., 2005; Hunt H.E. 2014).

Аллогенные стромальные клетки костного мозга используются во многих областях медицины. Известно, что аллогенные СККМ не обладают иммуногенными свойствами *in vitro*: они не индуцируют пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов и не являются мишенями для действия НК-клеток, в связи отсутствием антигена гистосовместимости II класса (HLA - II) и низким уровнем экспрессии антигена гистосовместимости I класса (HLA - I). Отсутствие комплекса HLA - II, главной антигенной системы, обеспечивает выживаемость неродственного трансплантата определяет его иммунологическую безопасность (Лазебник Л. Б., 2014).

Описаны способы пункционного введения СККМ после предварительной туннелизации дна дефекта, однако отрицательным эффектом является формирование плотных рубцов в области введения, беспорядочное распространение клеток по всей суставной полости с формированием спаек и тугоподвижности сустава (Zanasi S., 2006; Jiabing F., 2009). Для обеспечения достаточной концентрации клеток в области дефекта предложен способ хондропластики с использованием СККМ меченых наноферретами и направленного магнитного поля, однако, особенности технического процесса подготовки культуры клеток ограничивают его широкое применение. К недостаткам данного способа также можно отнести необходимость

длительной экспозиции специальным прибором для аккумуляции клеток в зоне повреждения (Vauge C., 2015). Предложены способы хондропластики, основанные на введении СККМ в составе различных гелей-носителей, однако, результаты проведенных исследований показывают, что в таких условиях имплантированные клетки теряют способность рецепторного и химического взаимодействия друг с другом, а также с периферией и дном дефекта, кроме того из-за физических свойств гелей часто нарушается трофика трансплантата (Johnstone B., 1998; Hwang N.S., 2007; Caron M.M., 2012). Наилучшие результаты лечения показывает применение СККМ в комбинации с матрицами-носителями (Kuroda R., 2007; Yan H., 2007). Описаны способы пункционного введения клеточной суспензии с помощью мягкого катетера в область обработанного дефекта, укрытого мембраной, но при таком введении не удается достичь равномерного распределения клеточной культуры в области дефекта (Татаренко-Козмина Т. Ю., 2007; Тихилов Р.М., 2010). Следующим этапом развития этого направления стала имплантация СККМ, нанесенных на различные твердые носители. В качестве матриц-носителей используются те же материалы, которые применяются при технике АМС или трансплантации хондроцитов (Haddo O., 2004; Uematsu K., 2005). Культивирование клеточной культуры СККМ в отличие от выращивания аутохондроцитов может быть выполнено без дополнительной травмы сустава (Прохоренко В.М., 2010). Стромальные клетки костного мозга обладают более высоким регенераторным и пролиферативным потенциалом по сравнению с хондроцитами, что позволяет надеяться на хорошие долгосрочные результаты лечения локальных повреждений суставного хряща, восстановленных с помощью этих методик (Peister A., 2004; Adachi N., 2007; Wakitani S., 2007; Filardo G., 2013).

Известно, что формирование и ремоделирование хряща происходят путем динамического изменения хондрального фенотипа с достижением

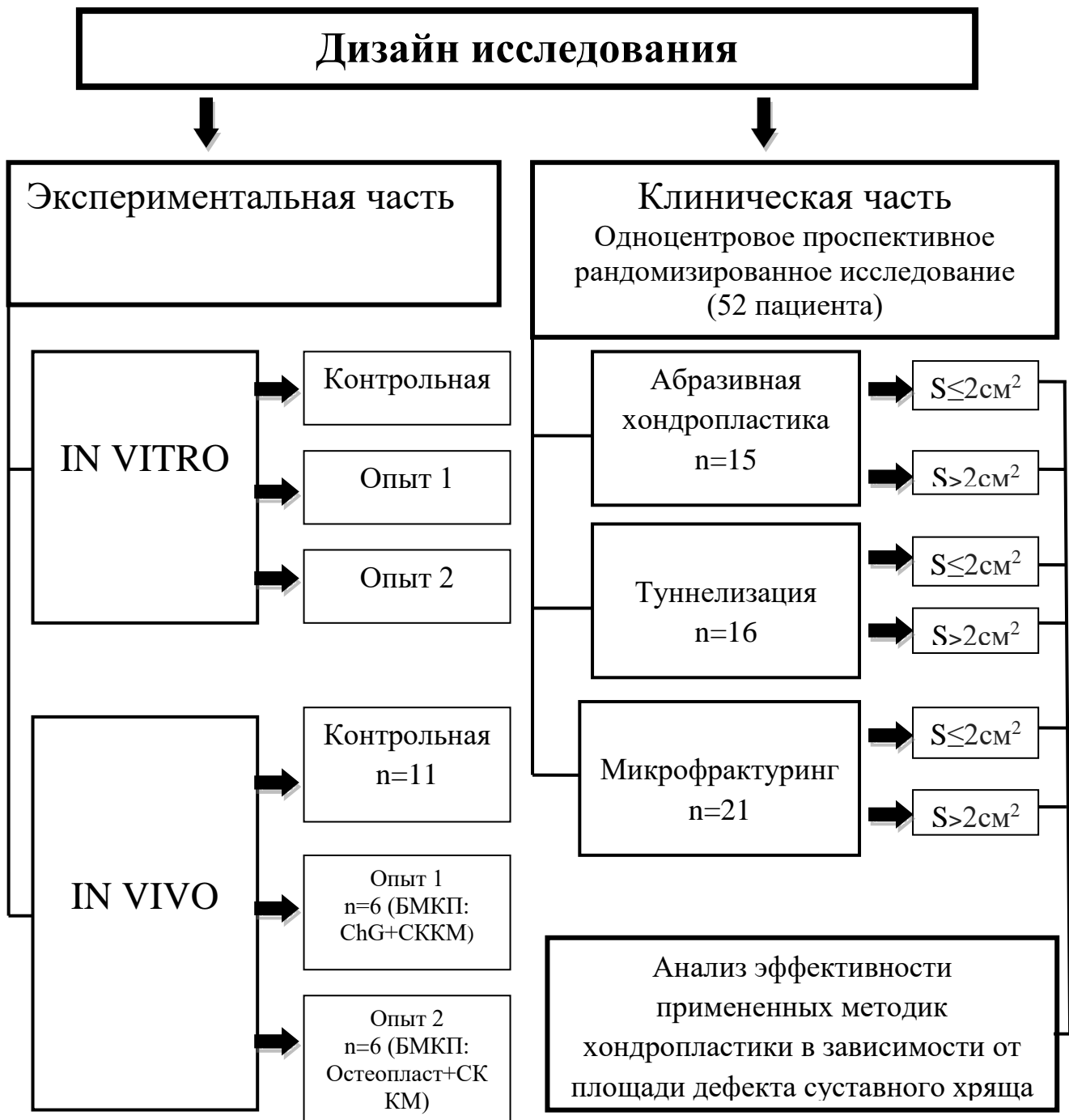
баланса синтетического и хондрорезорбтивного потенциалов (Куляба Т.А., 2011; Vecerra J., 2010; Batty L., 2011). Развитие новых технологий в области восстановления хрящевых повреждений обусловлено прогрессом и интегрированием нескольких направлений биоинженерии, таких как: культивирование и пересадка клеток, разработка новых биосинтетических матриц, применение молекулярных стимуляторов хондрогенеза и генной терапии (Павлова В.Н., 2011; Chang С.Н., 2004; Filardo G., 2013).

Принципиальным моментом при тканевой инженерии является возможность восполнения дефектов хрящевой ткани не просто биоинертным композитом с физико-химическими характеристиками, близкими к гиалиновому хрящу, а максимально адекватное замещение структурой с выраженной зональной организацией, устойчивой к последующему ремоделированию (Ларцев Ю.В., 2010; Новочадов В.В., 2014; Tetteh E.S., 2012).

Взаимодействие двух ключевых параметров: клеточной культуры и носителя, наряду с возможным добавлением факторов роста или механического раздражения определяет в конечном итоге успех биомедицинского клеточного продукта (Белгородцев С.Н., 2006; Деев Р.В., 2007; Schumann D., 2006; Uchio Y. , 2006; Atala A., 2012).

Однако, несмотря на растущее число способов хондропластики, проблема остается актуальной и на сегодняшний день, ввиду недостаточно органоспецифичного восстановления повреждений и ухудшения результатов лечения с течением времени. Новые знания, полученные в последние годы, а также разработка различных российских конкурентоспособных образцов каркасов-носителей, открывают широкие перспективы к поиску новых решений в сфере лечения локальных повреждений суставного хряща.

ГЛАВА 2. Материалы и методы.



2.1 Материалы и методы клинического этапа исследований.

Проводилось одноцентровое проспективное рандомизированное исследование результатов лечения 52 пациентов, которым по поводу локальных повреждений суставного хряща коленного сустава на базе ортопедического отделения взрослых «ННИИТО» («ПФМИЦ») в период с 2011 по 2015 годы выполнялись артроскопические остеоперфоративные методики стимуляции хондрогенеза.

Критериями включения пациентов в исследование служили:

- 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 см²;
- неэффективность консервативного лечения.

Критериями исключения пациентов были:

- возраст моложе 18 и старше 45 лет;
- степень повреждения суставного хряща менее чем 3 ст по Outerbridge;
- степень повреждения хряща смежной суставной поверхности выше 2 ст по Outerbridge;
- локализация дефекта суставного хряща на мыщелках большеберцовой кости;

- площадь дефекта более 4 см²;
- повреждения субхондральной кости (в том числе рассекающий остеохондрит);
- повреждения менисков;
- нестабильность коленного сустава.

Согласно критериям включения в исследование вошли 52 пациента: 37 мужчин (71%) и 15 женщин (29%), средний возраст составил 28,7±8,4 лет. Все пациенты в анамнезе имели травму коленного сустава, причем 62% обследуемых получили травму во время занятий спортом, 32% - в быту, 6% - в результате ДТП. Правый коленный сустав повреждался в 64% случаев, левый - в 36%. Первично за медицинской помощью в поликлинику по месту жительства обращались 83% больных. В 58% случаев для постановки диагноза на амбулаторном этапе выполнялась Rg-графия коленного сустава в 2-х стандартных проекциях, в 30% - УЗИ коленного сустава, в 12% - МРТ (80% исследований проведено на томографе 0,3 Тл, 20% - на томографе 1,5 Тл). После проведенного обследования 35% пациентов поставлен диагноз: повреждение менисков коленного сустава (S83.2, M23.2), 31% - гонартроз (M17.0, M17.3), 27% - повреждение капсульно-связочного аппарата коленного сустава (S83), 7% - другие диагнозы. В течение 32,3±15,4 дней в поликлинике по месту жительства проводился курс консервативного лечения: 100% пациентов получали НПВС в течение 1-2 недель, в 88% назначалась иммобилизация коленного сустава на срок от 2-х до 6-ти недель, в 62% - ФТЛ, в 75% - хондропротекторы, 18% больных выполнялось внутрисуставное введение препаратов глюкокортикостероидного ряда.

При неэффективности назначенного лечения пациенты обращались в консультативное отделение «ННИИТО» («ПФМИЦ»). На момент осмотра основными были жалобы на боль в области коленного сустава, ограничение

объема движений. После клинического осмотра проводилось дообследование: Rg-графия и МРТ коленного сустава (для пациентов, у которых ранее такое обследование не выполнялось). В 67% случаев на снимках МРТ визуализировались локальные дефекты суставного хряща коленного сустава разной локализации: 37% - блок бедренной кости, 32% - внутренний мыщелок бедренной кости, 17% - надколенник, 14% наружный мыщелок бедренной кости. Пациентам, не проходившим курс консервативного лечения в поликлинике по месту жительства, для уменьшения болевого синдрома, увеличения амплитуды движений коленного сустава назначали короткие курсы НПВС, ФТЛ, ЛФК, ограничение нагрузок, ношение ортопедических ортезов. Такой курс был эффективен для 35% пациентов. Они отмечали регресс клинических проявлений к 2-2,5 месяцам лечения. Показанием к артроскопическому вмешательству во всех случаях являлось сохранение болевого синдрома на фоне курса консервативного лечения в срок от 3 до 6 месяцев.

Непосредственно перед операцией все пациенты проходили обследование, включающее в себя: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, коагулограмма, электрокардиография, УЗИ вен и артерий нижних конечностей. Затем проводили рандомизацию по планируемому способу хондропластики и переходили к хирургическому лечению.

Для проведения оперативного вмешательства во всех случаях использовали артроскопическую стойку «Smith&Nephew» с набором ручного инструментария «Acufex», шейвер с костными бурами и синовиальными фрезами, холодно-плазменный аблятор фирмы «ArthroCare». Под спинальной анестезией пациент укладывался на операционном столе в положении лежа на спине, нижние конечности согнуты в коленных суставах под углом 90 градусов, при этом оперируемая жестко фиксирована на подставке на уровне

средней трети бедра. Применялись стандартные переднелатеральный и переднемедиальный артроскопические доступы. Оперативное вмешательство начиналось с диагностической артроскопии: осмотр верхнего заворота и пателло-фemorального сочленения; ревизия медиального отдела при сгибании и разгибании с вальгусным отклонением голени для расширения медиальной суставной щели; затем осмотр переднего отдела сустава при постепенном сгибании до 90 градусов; осмотр латерального отдела в положениях сгибания и разгибания с варусным отклонением голени для расширения латеральной суставной щели.

При артроскопии оценивались следующие характеристики хряща для определения характера и степени его дегенерации и повреждений:

- цвет – здоровый хрящ белого цвета с желтоватым оттенком. При дегенерации его окраска становится более желтой.
- эластичность определялась по реакции расправления хряща после надавливания диагностическим щупом. При дегенерации эластичность снижается;
- поверхность – здоровый хрящ ровный, без нарушения целостности и без локальных утолщений и включений;

Выявленные изменения суставного хряща коленного сустава оценивались по следующим параметрам:

- локализация: дефекты хрящевого покрова на нагружаемых поверхностях мыщелков бедра и голени имеют более выраженное клиническое значение;
- глубина и площадь: имеют важнейшее клиническое значение, определяются с помощью диагностического щупа;

- форма и состояние краевых отделов дефекта оценивались на границе поражения и нормального хряща.

Расхождение данных артроскопической картины и МРТ по локализации и распространенности повреждений суставного хряща наблюдали у 14 пациентов (в 27% случаев).

Визуальная и инструментальная оценки ограниченных дефектов суставного хряща при артроскопии позволяли определить стадию повреждения по классификации Outerbridge.

Классификация Outerbridge (Outerbridge R.E., 1961):

Стадия 0: нормальный хрящ;

Стадия 1: размягчение и набухание хряща;

Стадия 2: дефекты или поверхностные трещины хряща, которые не превышают 1,5 см в диаметре (< 50% толщины хряща);

Стадия 3: дефекты хряща, превышающие 1,5 см в диаметре (>50% толщины хряща);

Стадия 4: поражение хряща до субхондральной кости.

Во всех случаях при выявлении ограниченных дефектов суставного хряща 3,4 ст по Outerbridge площадью не более 4 см² с помощью стандартного набора инструментов выполняли один из остеоперфоративных способов хондропластики (мезенхимальной стимуляции хондрогенеза): абразивную хондропластику, туннелизацию или микрофрактуринг. Результатом применения данных хирургических техник являлось заполнение дна дефекта сгустком крови с элементами костного мозга. Для профилактики увеличения площади дефекта и стабилизации его краев выполнялась

кобляция пограничных отделов суставного хряща. Операция заканчивалась швом артроскопических доступов.

Таким образом, из 52 пациентов в результате рандомизации были сформированы 3 группы:

1 группа – 15 пациентов, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялась абразивная хондропластика;

2 группа – 16 – пациентов, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялась туннелизация;

3 группа – 21 пациент, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялся микрофрактуринг.

В ортопедическом отделении после операции пациенты находились в среднем 2 дня, затем все пациенты получали стандартное восстановительное лечение, включающее в себя ограничение осевой нагрузки до 6 недель, курсы ЛФК с ранним началом пассивных движений на электромеханических аппаратах и ФТЛ.

В связи с тем, что показания к выполнению остеоперфоративных способов хондрогенеза часто рознятся, а площадь повреждения варьирует при этом в диапазоне $0 < S \leq 4 \text{ см}^2$, для оценки эффективности применения этих способов хондропластики в зависимости от площади дефекта суставного хряща все группы были разделены на 2 подгруппы:

1 - площадь дефекта хряща $S \leq 2 \text{ см}^2$;

2- площадь дефекта $2 < S \leq 4 \text{ см}^2$.

Распределение пациентов в группах по площади дефекта представлено в Таблице 1.

Таблица 1.

Распределение пациентов в группах по площади дефекта

Способ хондропластики\площадь дефекта, см ²		$S \leq 2$	$2 < S \leq 4$
Абразивная хондропластика (n=15)	Абс	10	5
	Относ.,%	66	33
Туннелизация (n=16)	Абс	14	2
	Относ.,%	87	13
Микрофрактуринг (n=21)	Абс	15	6
	Относ.,%	72	28
P		P _{аб,т} =0,1384 P _{аб,м} =0,8639 P _{т,м} =0,2520	P _{аб,т} =0,3388 P _{аб,м} =0,9512 P _{т,м} =0,4393

Показатели Таблицы 1 демонстрируют отсутствие статистически значимой разницы между исследуемыми группами.

Для анализа функции коленного сустава в динамике: до операции, через 3,6,12,24 месяца после операции, была использована 100-бальная шкала Joseph & Kaufman (Зоря В.И., 2010) (приложение 1), которая позволяла оценить боль при ходьбе и в покое, функцию при различных уровнях нагрузки, амплитуду активных и пассивных движений коленного сустава, его стабильность, угловую деформацию, а также мышечную силу четырехглавой мышцы бедра. Результаты оценивались от 0 до 100, где 0 это минимальное значение, а 100 - максимальное. Результаты:

- 90-100 отличные
- 80-89 хорошие
- 70-79 удовлетворительные
- менее 70 неудовлетворительные

Качественные показатели шкалы Joseph & Kaufman до операции представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Качественные показатели шкалы Joseph & Kaufman до операции

Группы\кач. показатели		Удов.	Неудов.
Абразивная хондропластика (n=15)	Абс	13	2
	Относ.,%	86	13
Туннелизация (n=16)	Абс	15	1
	Относ.,%	94	6
Микрофрактуринг (n=21)	Абс	20	1
	Относ.,%	95	3
P ($\chi^2_{\text{вет}}$)		$P_{\text{аб,т}}=0,9531$ $P_{\text{аб,м}}=0,7598$ $P_{\text{т,м}}=0,5923$	$P_{\text{аб,т}}=0,9531$ $P_{\text{аб,м}}=0,7598$ $P_{\text{т,м}}=0,5923$

Согласно данным Таблицы 2 до оперативного лечения у пациентов наблюдались удовлетворительные и неудовлетворительные значения качественных показателей шкалы Joseph & Kaufman, при этом статистически значимой разницы между группами не выявлено.

Таким образом, сравнительное исследование эффективности различных методик мезенхимальной стимуляции хондрогенеза проводилось на достаточно однородных группах.

2.2 Материалы и методы экспериментального этапа исследования.

2.2.1 Характеристика матриц – носителей, используемых в составе БМКП.

В ходе эксперимента по созданию биомедицинского клеточного продукта для восстановления ограниченных дефектов суставного хряща использованы коллагеновые матрицы с разной структурой: «Chondro Gide» и «Остеопласт».

Мембрана «Chondro Gide» состоит из коллагена I и III типа в виде двухслойной матрицы с плотной и пористой сторонами. Исходным материалом является свиной коллаген. Плотный слой представляет собой гладкую непроницаемую поверхность. Другой слой состоит из коллагеновых волокон в виде волокнистой пористой структуры, которая способствует проникновению клеток и их адсорбции. Срок резорбции 3-6 месяцев.

Коллагеновая матрица «Остеопласт» получена из свиной губчатой костной ткани и имеет ее структуру и архитектуру. При этом волокна коллагена, формирующие губчатую кость в продольном и поперечном направлениях, перекрывают каждые подлежащие пучки волокон, что обеспечивает высокую пористость препарата. Размер лакун от 220 до 700 мкм. Срок резорбции 4-6 месяцев.

2.2.2 Эксперимент *in vitro*

Экспериментальные исследования включали изучение цитотоксичности и адгезивных свойств коллагеновых матриц-носителей «Chondro Gide» и «Остеопласт» *in vitro*.

Исследования цитотоксичности препаратов проводились в лаборатории биотехнологий ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России (руководитель к.м.н. Д.Я. Алейник).

В качестве источника СККМ отобрали двух здоровых кроликов породы «Серый великан». В работе использовали стромальные клетки костного мозга кроликов, выделенного из подвздошных и бедренных костей животных. Для выделения клеток из костного мозга применяли метод селективной адгезии к пластику. Культивирование проводили по

стандартной технологии в атмосфере 5% CO₂, 37°C, абсолютной влажности. В качестве ростовой среды применяли среду α -MEM (Sigma, США), с добавлением антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), 2% глутамина и 20% ТЭС (Gibco), культуральные флаконы Costar, США. Смену среды проводили дважды в неделю. По достижении субконфлюэнтного монослоя культуру пересеивали. В экспериментах использовали культуру 3-4 пассажа. Состояние культуры в динамике оценивали с помощью инвертированного микроскопа «Leica DMI 3000B», оснащенного программой визуализации изображений LAZ. V. 3.4, и фиксировали в видеоархив. Концентрацию и жизнеспособность клеток подсчитывали с помощью счетчика клеток «Countes», Invitrogen, США, применяя прижизненный краситель трипановый синий.

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки использовали набор Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, USA). В качестве специфических красителей для оценки дифференцировки применяли: 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 (Becton Dickinson, USA) с использованием моноклональных антител CD 45, CD105, CD 44 с соответствующими изотипическими контролями. Результаты выражали, как долю клеток, несущих соответствующий маркер (в %).

Сравнительное исследование цитотоксичности проводили согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 методом прямого контакта, так как исследуемые материалы использовались в непосредственном контакте с кровью и тканями. СККМ кролика засеивали с плотностью 5 тыс./ см² в чашки Петри площадью

7 см². Через 24 часа после посева отмечали формирования монослоя на поверхности пластика, после чего осторожно, стараясь не повредить клетки, на них переносили образцы коллагеновых матриц «Остеопласт» и «Chondro Gide», предварительно промытые в среде 199 с антибиотиками (пенициллин/стрептомицин) в течение 24 часов. Размер каждого образца составлял 0,7 см² (10% от площади чашки). Контролем служили культура в чашках без матриц. Каждые 24 часа после начала взаимодействия с образцами фиксировали состояние культуры в видеоархив. По достижении конфлюэнтного монослоя (96 часов) в контрольных сериях оценивали морфологию клеток, состояние монослоя, после чего культуру с чашек с контрольными и опытными сериями снимали с помощью раствора трипсина с ЭДТА, подсчитывали плотность и жизнеспособность клеток. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Для оценки адгезии клеток на поверхности и в толще мембраны «Chondro Gide» и матрицы «Остеопласт» взвесь СККМ 3 пассажа в концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл засеивали на поверхность каркасов и вводили непосредственно в их толщу с помощью шприца. После введения клеточной суспензии в чашки добавляли ростовой среды до общего объема 2 мл для того, чтобы образцы были погружены в среду. Чашки с образцами помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях, культивировали и контролировали рост культуры в течение 96 часов, проводя видеоархивирование каждые 24 часа. Каждые 48 часов проводили смену ростовой среды.

Через 48 часов культивирования часть образцов забирали для исследования методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cytation 5 (BioTek, USA), позволяющем визуализировать клетки не только на поверхности, но внутри мембран.

Прижизненное окрашивание ядер клеток, адгезировавшихся на материале, проводили с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) обладающего высокой специфичностью к двухцепочечной молекуле ДНК (длина волны возбуждения 377 нм, длина волны эмиссии 447 нм). Окрашивание проводили в соответствии с протоколом производителя.

Для маркировки живых клеток и характеристики их морфологии использовали кальцеин (Calcein AM, BD Pharmingen™), легко проникающий в жизнеспособные клетки. Внутри клеток эстеразы отщепляют аминокислоты от не флуоресцентного кальцеина, который после этого начинает флуоресцировать (длина волны возбуждения 469 нм, длина волны эмиссии 525 нм). Окрашивание Calcein проводили в соответствии с протоколом производителя.

Часть образцов обеих мембран с клетками культивировали в стандартных условиях в течение 96 – 120 часов, каждые 24 часа контролируя миграцию клеток из образцов на пластик.

Подготовка БМКП «Chondro Gide + СККМ» и «ОСТЕОПЛАСТ + СККМ» для исследования *in vivo*. Для исследования совместного действия СККМ и «Chondro Gide», СККМ и «Остеопласт» на процессы восстановления повреждения хряща СККМ кролика 3 пассажа в концентрации 2 млн/мл вводили шприцом непосредственно в толщу образцов, каждый из которых был 0,33 см в диаметре, и засеивали на его поверхность. Образцы предварительно промывались в ростовой среде в течение 24 часов. После введения клеточной суспензии добавляли ростовую среду до общего объема 2 мл. Чашки с образцами помещали в CO₂ – инкубатор при стандартных условиях. Через 24 часа образцы отмывали физиологическим раствором и предавали для введения животным.

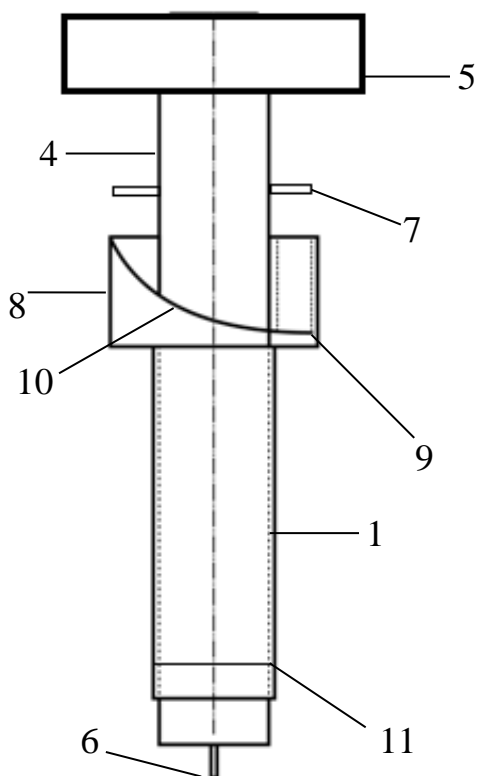
2.2.3 Эксперимент *in vivo*

Эксперимент проводился на кроликах породы «Серый великан» 6-11 месячного возраста весом от 2900 до 5000 г. в отделении экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России (руководитель д.м.н., проф. С.П. Перетягин) согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург 18.05.2014г.). Все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Условия содержания животных в виварии обеспечивали чистоту эксперимента. Выведение животных из эксперимента осуществляли воздушной эмболией под наркозом.

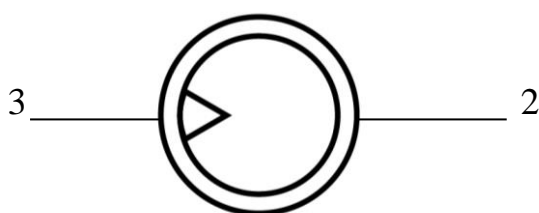
Выбор кроликов в качестве лабораторных животных обусловлен достаточно полными данными об их анатомии и физиологии, частым использованием их для изучения регенерации тканей, в том числе суставного хряща (Yan H., 2007; Chen H., 2008).

Принятая исследований модель ограниченного дефекта суставного хряща готовилась с помощью устройства для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности (Патент РФ №164921) (Рис.1: Фиг. 1, Фиг. 2).

Устройство для забора костно – хрящевых фрагментов суставной поверхности.



Фиг. 1



Фиг. 2

Устройство содержит полый цилиндрический корпус (1), на нижнем рабочем торце которого имеется внутренняя фаска с заточкой (2) и режущий инструмент (3), выступающий к центру окружности перпендикулярно оси корпуса (1). В корпусе (1) размещен стержневой толкатель (4) с рукояткой (5) и игольчатым наконечником (6) на нижнем конце. На уровень максимального

заданного погружения толкателя (4) выполнена пара поперечных ограничителей хода (7) с выступающими концами. В верхней части корпуса (1) смонтирована переходная втулка (8) с двумя диаметрально расположенными внутренними пазами (9) и скошенными боковыми стенками (10) под ограничители хода (7). Нижнее основание полости каждого паза соединено скошенной стенкой с верхней полостью противоположного паза. По внешней стороне нижнего рабочего торца корпуса (1) нанесена проточка (11), высота которой равна длине игольчатого наконечника (6).

Устройство использовалось следующим образом: под наркозом, после подготовки операционного поля (удаления ножницами волосяного покрова в области оперируемого сустава, трехкратного дезинфицирования растворами антисептиков, отграничения стерильным бельем), прямым разрезом 3 см по передне-внутренней поверхности в области коленного сустава осуществлялся доступ к внутреннему мыщелку бедренной кости, надколенник смещался кнаружи, производился гемостаз. В полем цилиндрическом корпусе размещали стержневой толкатель и устанавливали его нижним рабочим торцом перпендикулярно суставной поверхности. Вращали рукоятку и помещали выступающие концы ограничителя хода в пазы переходной втулки. Продолжали вращение рукоятки, погружая рабочий торец с режущим инструментом до уровня проточки, при этом прокалывали костно-хрящевой фрагмент игольчатым наконечником, затем извлекали устройство вместе с отсеченным участком суставной поверхности (Рис. 2).

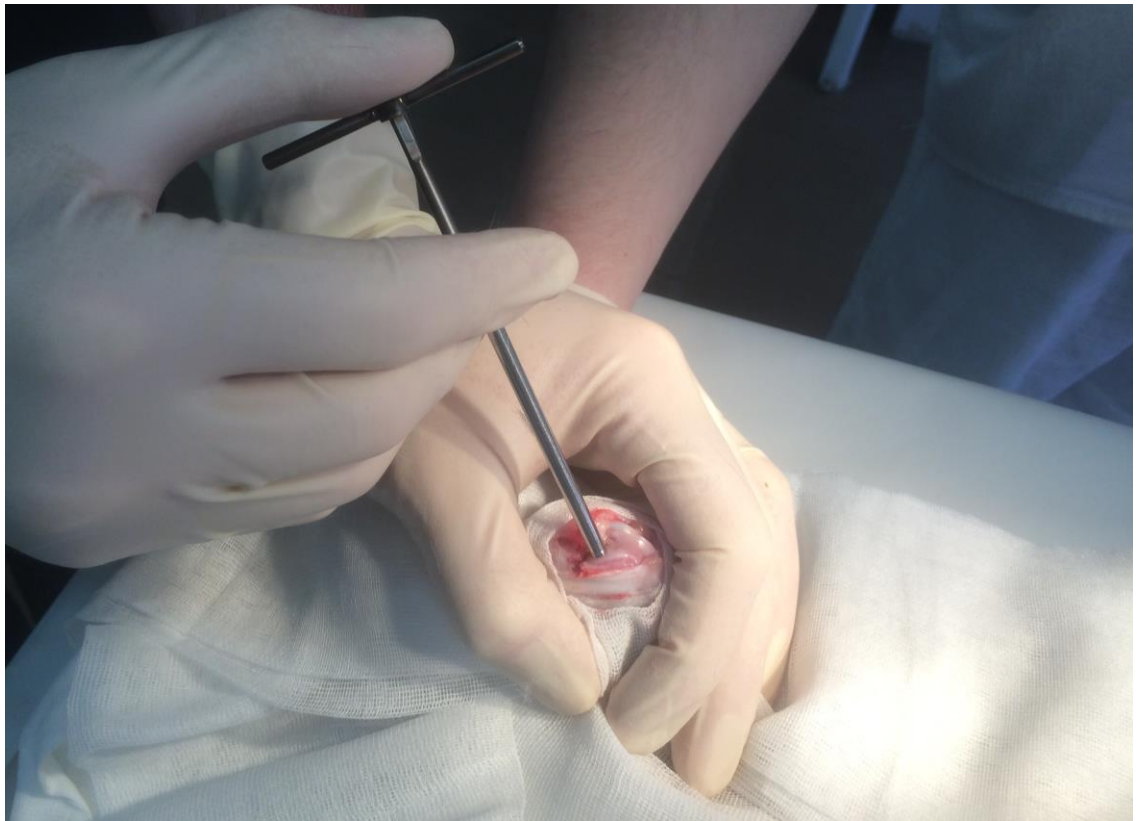


Рис. 2 Этап формирования дефекта суставной поверхности.

Данное устройство для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности позволило сформировать однотипные цилиндрические дефекты 3,3 мм в диаметре и 1,5 мм глубиной у всех животных в каждой группе эксперимента (Рис. 3).

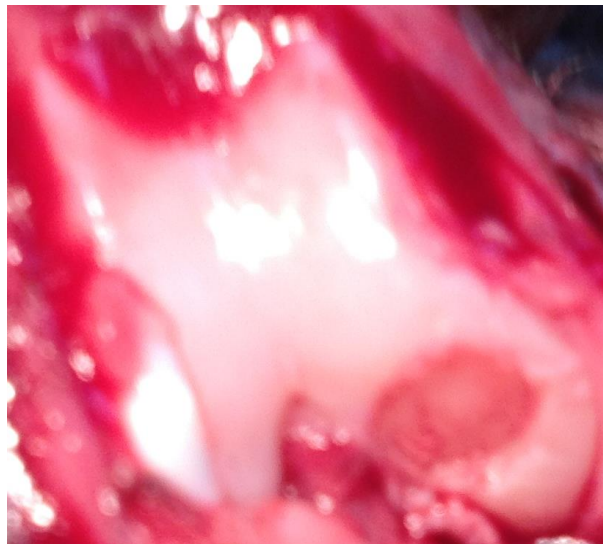


Рис. 3 Сформированный дефект суставного хряща.

У лабораторных животных контрольной группы оперативное вмешательство ограничивалось формированием костно-хрящевого дефекта суставной поверхности с последующим послойным ушиванием раны наглухо.

У кроликов двух опытных групп после формирования дефекта суставного хряща внутреннего мыщелка бедренной кости производилось его замещение с помощью ранее подготовленных клеточно-инженерных конструкций.

В группе Опыт 1 БМКП состоял из двухслойной непроницаемой коллагеновой матрицы «Chondro Gide» с предварительно выращенными на ней аллогенными стромальными клетками костного мозга. Биомедицинский клеточный продукт имел диаметр, соответствующий диаметру дефекта равный 3,3 мм, перемещался в область ранее сформированного дефекта, укладывался на одном уровне с окружающей хрящевой тканью (Рис. 4). Для достижения первичной стабильности по периферии БМКП тонкой полоской наносился фибриновый клей «Tissucol Kit» в стандартном разведении. Оперативное вмешательство заканчивалась послойным швом раны наглухо. Иммобилизация в послеоперационном периоде не использовалась.



Рис. 4 Сформированный дефект замещен биомедицинским клеточным продуктом СККМ + «Chondro Gide».

Во второй опытной группе проводили то же оперативное вмешательство, но в качестве матрицы-носителя в составе БМКП использовался трехмерный проницаемый коллагеновый сетчатый каркас «Остеопласт» (Рис. 5).



Рис. 5 Сформированный дефект замещен биомедицинским клеточным продуктом СККМ + «Остеопласт».

У животных опытных групп хирургические вмешательства выполняли одновременно на двух коленных суставах. Последующее наблюдение и уход за животными осуществлялся совместно с сотрудниками отделения экспериментальной хирургии и вивария.

Через 3 месяца после оперативного вмешательства из эксперимента были выведены 5 кроликов контрольной группы (8 оперированных суставов) и по 3 животных из опытных групп (по 6 оперированных суставов в каждой группе), для последующего гистоморфологического исследования осуществлен забор дистального эпифиза бедренных костей.

Через 6 месяцев из эксперимента были выведены оставшиеся животные: 4 из контрольной группы (7 оперированных суставов), 3 животных (6 оперированных суставов) из группы Опыт 1 (БМКП: СККМ + «Chondro Gide»), 3 животных (6 оперированных суставов) из группы Опыт 2 (БМКП: СККМ + «Остеопласт»).

Общие сведения об экспериментальных животных представлены в Приложении 2.

2.2.4 Морфологическое исследование биоптатов

Образцы тканей дефекта, изъятых после выведения животных из эксперимента, подвергали гистоморфологическому исследованию в группе патологической анатомии и консервации тканей ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России (руководитель к.м.н. С.Н. Бугров).

2.2.4.1 Гистоморфологический метод

Экспериментальные образцы фиксировались в растворе нейтрального формалина. Проводка и обработка материала выполнялась по стандартным методикам. Декальцинацию проводили с использованием среды Biodesc-R (Bio-Optica). Стандартная гистологическая проводка осуществлялась на аппарате ExcelsiorES (ThermoScientific). После проводки изготавливались 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.

При оценке микроскопической картины 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.

2.2.4.2. Морфометрический метод

С помощью морфометрического метода проводили измерение высоты восстановленной хрящевой пластинки только в участках хрящевой ткани, имеющих целостную структуру, то есть без факта наличия фрагментации ткани. Измерениям подвергались 5 срезов области дефекта каждого оперированного сустава. Учитывая диаметр дефекта равный 3300 мкм, для стандартизации проводили морфометрическое исследование срезов с шагом 600 мкм (Рис. 6).

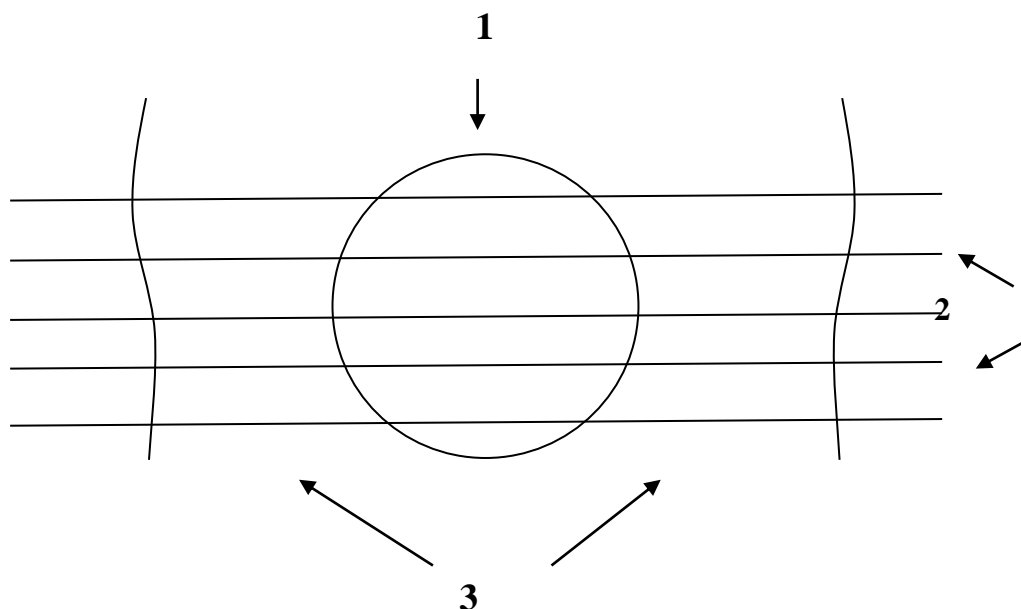


Рис. 6 Схема расположения срезов для морфометрического исследования. 1 - область дефекта суставного хряща, 2 - срезы, 3 - внутренний мыщелок бедренной кости.

При этом, каждый срез разделялся на семь секторов: 2 краевых сектора суставного хряща, граничащих с зоной дефекта медиально и латерально, где в случайном месте на расстоянии до 100 мкм от края производились измерение высоты хряща, и 5 равнопротяженных секторов области дефекта,

в центре каждого из которых выполнялись измерения высоты восстановленной ткани (Рис. 7).

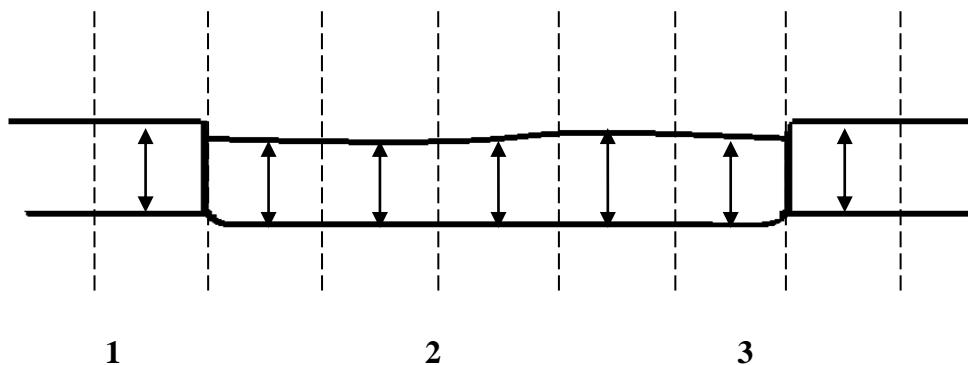


Рис. 7 Схема морфометрического исследования восстановленного дефекта суставного хряща. 1 - Медиальный край, 2 - Зона дефекта, 3 - Латеральный край

При этом каждое значение высоты восстановленного хряща области дефекта сопоставлялось с измерением в пограничной зоне.

Для оценки результатов измерений был предложен и использован коэффициент восстановления области дефекта (КВ), рассчитываемый как отношение высоты восстановленной ткани в области дефекта, мкм (h_d) к высоте суставного хряща в зонах, граничащих с дефектом, мкм (h_k).

$$КВ = \frac{h_d}{h_k}$$

Полученные данные представлены в Приложении 3.

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.

2.2.5. Методика статистической оценки результатов.

Проверка статистических гипотез эксперимента проводилась с использованием критериев статистического метода «Случай-контроль» (Котельников Г.П., 2000).

Проводилась оценка эффективности использования различных БМКП в эксперименте *in vivo*. Для расчета прогностической ценности положительного результата (значение $KB \geq 0,85$) 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 ($KB < 0,85$) в группе Опыт 1 (ЧИК) и группе Опыт 2 (ЧИЛ). Также оценивалась частота благоприятных исходов лечения в тех же группах (ЧБИЛ 1 и ЧБИЛ 2).

Затем были рассчитаны следующие показатели:

1. Снижение абсолютного риска (САР) – абсолютная арифметическая разница в частоте неблагоприятных исходов между опытными группами:

$$САР = ЧИЛ - ЧИК;$$

2. Снижение относительного риска (СОР) – относительное снижение частоты неблагоприятных исходов в группе Опыт 1 по сравнению с группой Опыт 2:

$$СОР = (ЧИЛ - ЧИК) / ЧИК;$$

3. Число больных, которых необходимо лечить каждым исследуемым способом для предотвращения неблагоприятного исхода у одного больного (ЧБНЛ):

ЧБНЛ = 1 / САР;

4. Отношение шансов (ОШ) = (ЧИЛ/ ЧБИЛ2)/(ЧИК/ ЧБИЛ1).

Показатели снижения относительного и абсолютного рисков рассчитывали с 95% доверительным интервалом.

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

В клинической части работы проводили сравнительное проспективное рандомизированное исследование остеоперфоративных способов хондропластики, оценивая средние со стандартными отклонениями шкалы Joseph&kaufman, использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса, проводили корреляционный анализ (γ критерий) между площадью дефекта суставного хряща и результатами хирургического лечения.

Согласно рекомендациям к проведению медико-санитарных исследований уровень статистической значимости «р» в работе принят равным 0,05 (Едронова В.Н., 2010).

ГЛАВА 3. Результаты хирургического лечения пациентов с ограниченными дефектами суставного хряща.

В ходе исследования были проанализированы результаты лечения пациентов с локальными дефектами суставного хряща коленного сустава, для восстановления которых были применены артроскопические остеоперфоративные методы стимуляции хондрогенеза.

После проведения оперативного лечения оценивались изменения качественных и количественных показателей шкалы Joseph & Kaufman через 3, 6, 12, 24 месяца. Полученные данные представлены в Таблице 3.

Таблица 3.

Количественные показатели шкалы Joseph & Kaufman в динамике

(M ± σ)

Период наблюдения\Группы	Абразивная хондропластика (n=15)	Туннелизация (n=16)	Микрофрактуринг (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} =0,0000 P _{3,6} =0,0105 P _{6,12} =0,0007 P _{12,24} =0,2610 P _{до,24} =0,0001	P _{до,3} =0,0000 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 некоторые исследователи 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. Полученные данные приведены в Таблице 4.

Таблица 4.

Частота хороших и отличных результатов через 24 месяца в зависимости от площади 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	$P_{аб,т}=0,0558$ $P_{аб,м}=0,8089$ $P_{т,м}=0,0169$
$2 < S \leq 4$ (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 см², при этом не наблюдали статистически значимой разницы между применяемыми методиками. У 7 пациентов с площадью дефекта $2 < S \leq 4$ см² 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.

Проведенный корреляционный анализ на сроках наблюдений 3 и 24 месяца демонстрирует обратную связь между исходной площадью дефекта суставного хряща и результатами лечения, соответствующими

показателям шкалы Joseph & Kaufman. Полученные данные представлены в Таблице 5.

Таблица 5.

**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	$\gamma = -0,67$ $p = 0,0164$	$\gamma = -0,70$ $p = 0,0168$	$\gamma = -0,61$ $p = 0,0039$
24 мес	$\gamma = -0,78$ $p = 0,0126$	$\gamma = -0,56$ $p = 0,0038$	$\gamma = -0,80$ $p = 0,0010$

Учитывая данные таблицы 5 следует, что лечение ограниченных дефектов суставного хряща с помощью остеоперфоративных методик стимуляции хондрогенеза нецелесообразно при площади дефекта свыше 2 см². 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 см². При этом статистически значимой разницы между абразивной хондропластикой, туннелизацией и микрофрактурированием не выявлено. Возможно применение любого из вышеуказанных методов в зависимости от оснащения операционной и личных предпочтений хирурга.

Вместе с тем, ввиду отсутствия единого подхода к лечению больших по площади дефектов суставного хряща остается актуальной разработка новых вариантов хондропластики, и наиболее перспективными для органоспецифического восстановления представляются способы, основанные на имплантации клеточных культур, интегрированных в структуру каркасов-носителей. Учитывая то, что многие публикации демонстрируют отсутствие статистически значимой разницы в результатах лечения между остеоперфоративными способами хондропластики и аутотрансплантацией хондроцитов в течение 2-5 лет наблюдений (Knutsen G, 2007), наибольший интерес по сравнению с хондроцитами вызывают стромальные клетки костного мозга. А из всего разнообразия каркасов-носителей лучшие условия для формирования регенерата позволяют создать коллагеновые сетчатые матрицы. В настоящее время в дополнение к известным зарубежным образцам пришли отечественные разработки, которые при сопоставимости структурных характеристик значительно доступнее в экономическом отношении.

Суммируя вышесказанное, следует отметить, что восстановление больших по площади локальных дефектов суставного хряща остается нерешенной проблемой современной ортопедии, но внедрение в практику резорбируемых каркасов-носителей российского производства, а также

развитие и распространение клеточных лабораторий в нашей стране создает условия для поиска новых путей решения этой проблемы, одним из которых является разработка различных комбинаций структуры биомедицинских клеточных продуктов.

ГЛАВА 4. Результаты экспериментальных исследований.

4.1. Анализ цитотоксичности и адгезивных свойств используемых матриц-носителей.

Международное общество по клеточной терапии определило минимальные критерии, которым должны соответствовать СККМ человека. Во-первых, СККМ должны хорошо распластываться на пластике при соблюдении стандартных условий культивирования; во-вторых, должны экспрессировать CD105, CD73 и CD90 при отсутствии экспрессии CD45, CD34, CD14, CD19 и HLA-DR на поверхности молекулы и, в-третьих, СККМ должен дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты в условиях *in vitro* (Dominici M et al. 2006). СККМ животных должны обладать аналогичными характеристиками.

На протяжении всего периода наблюдения выделенные клетки кролика хорошо распластывались на поверхности пластика и сохраняли типичную фибробластоподобную форму с четкими контурами и выраженными отростками. СККМ кролика, как правило, были более крупными, чем СККМ человека, имели больше отростков, крупные овальные ядра, от двух до четырех ядрышек. На рисунке 8 показана морфология культуры перед введением в эксперимент (Рис.8).

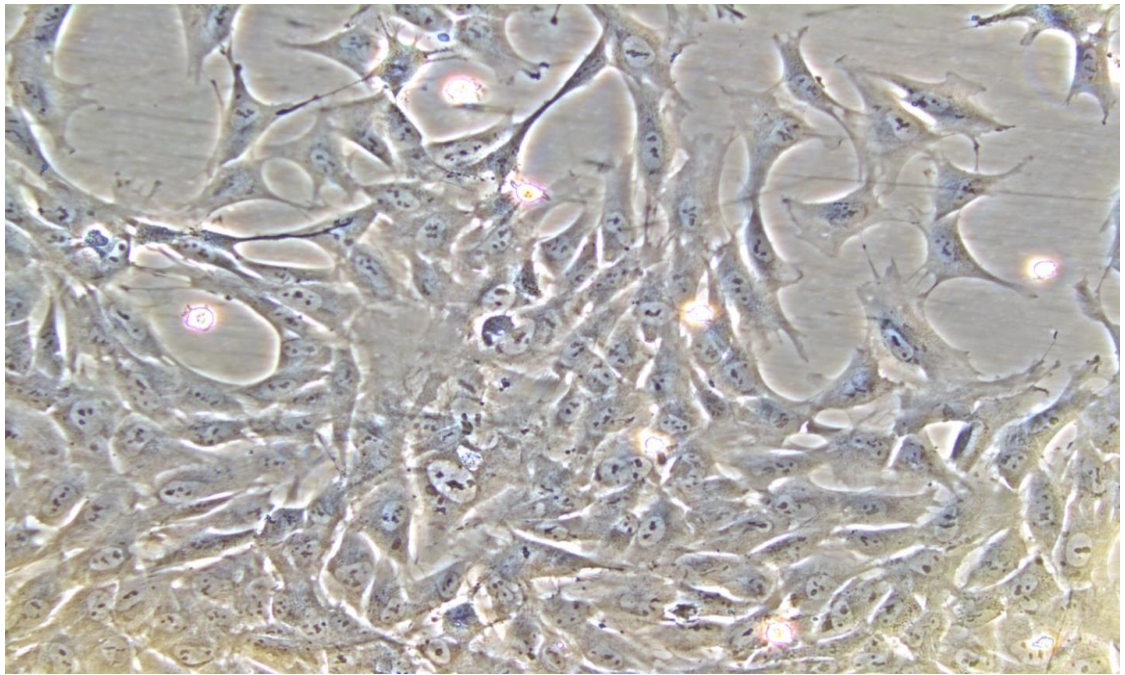


Рис. 8. Культура СККМ кролика, 3 пассаж, фазовый контраст (Увеличение 200).

При проведении оценки дифференцировочного потенциала культур, выделенных из костного мозга кроликов, выявлено, что на 8 сутки после введения дифференцировочных сред в клетках фиксировалось образование жировых вакуолей (Рис. 9а, 9б), окрашенных Oil Red.

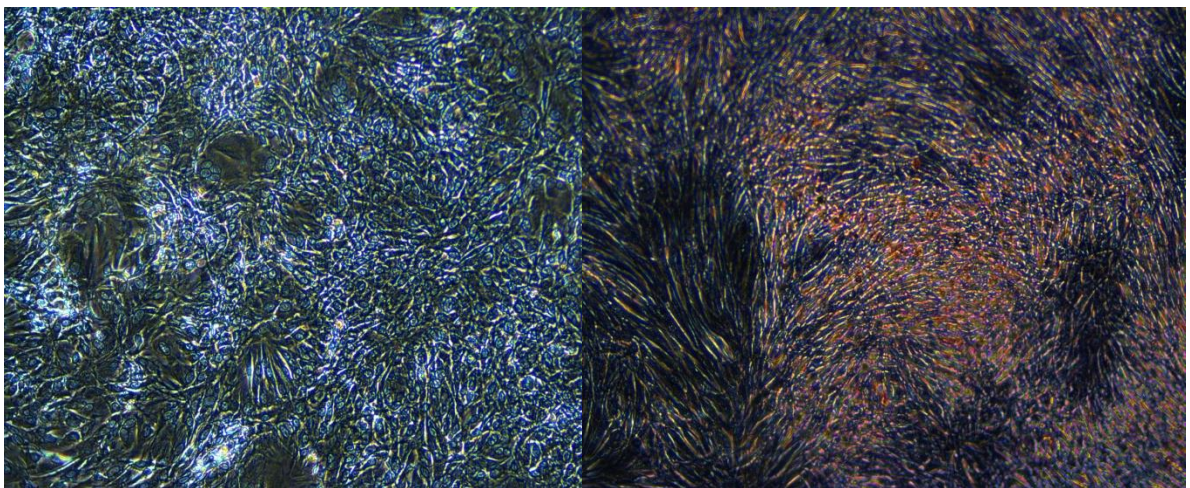


Рис. 9а. контроль

Рис. 9б. опыт

Рис. 9. Адипогенная дифференцировка СККМ кролика (Окраска Oil Red. Увеличение 100).

Образование типичных для хондрогенной дифференцировки шариков (pellet) фиксировалось в пробирках уже через сутки после добавления среды ДМЕМ/F12 с дифференцировочной добавкой (Рис. 10).

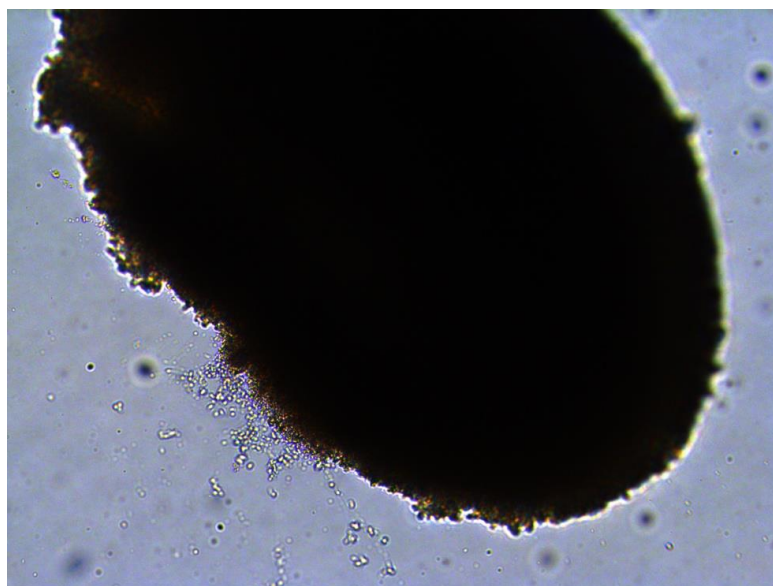


Рис. 10. Хондрогенная дифференцировка СККМ кролика, образование шариков (Увеличение 100).

Об остеогенной дифференцировке свидетельствовала специфическая окраска солей кальция ализариновым красным (Рис. 11а, 11б), появление которой фиксировалась в культурах, выделенных из костного мозга кролика, на 11сутки.

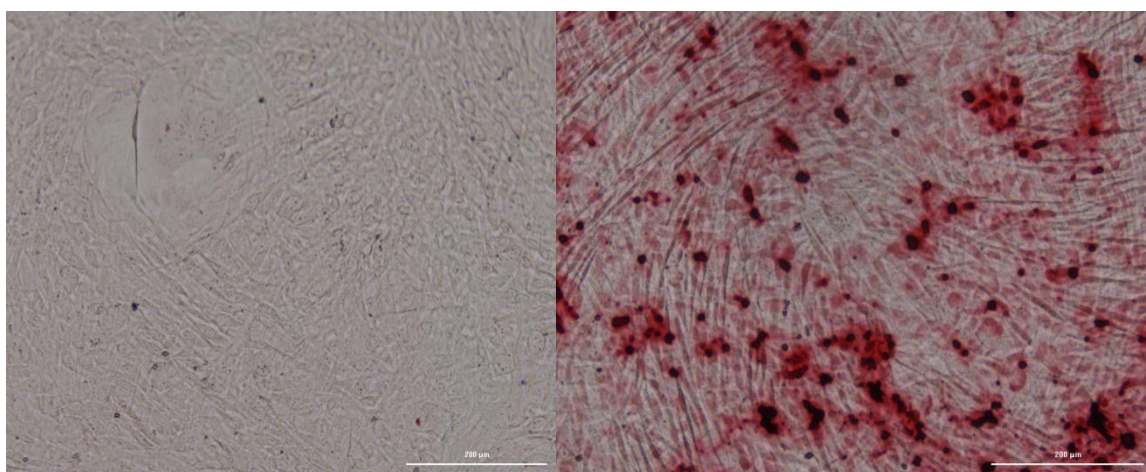


Рис. 11а. контроль

Рис. 11б опыт.

Рис. 11. Остеогенная дифференцировка СККМ (Окраска ализариновый красный. Увеличение 100).

При определении фенотипа клеток выявлено, что большинство клеток (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 соответствовало фенотипу СККМ.

Таким образом, клетки, выделенные из костного мозга кролика, хорошо распластывались и адгезировались на пластике, были способны к дифференцировке в трех направлениях (в адипоциты, остециты и хондроциты), несли маркеры, характерные для стромальных клеток и, следовательно, по своему происхождению и характеристикам являлись стромальными клетками костного мозга.

При оценке цитотоксичности 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 и культура была снята с помощью смеси трипсина с ЭДТА, жизнеспособность и плотность клеток в опытных и контрольных сериях не отличалась (таблица 6).

Таблица 6.

Изменение плотности клеток при культивировании с образцами матриц «Chondro Gide» (Группа 1) и «Остеопласт» (Группа 2).

Опыт \ группа	Плотность клеток на 1 см ² (M ± σ)			Жизнеспособность в % (M ± σ)		
	№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
Р	Р _{контр,гр1} =0,1 229	Р _{контр,гр1} =0,2 433	Р _{контр,гр1} =0,0 895	Р _{контр,гр1} =0,4 177	Р _{контр,гр1} =0,3 221	Р _{контр,гр1} =0,1 721
	Р _{контр,гр2} =0,1 423	Р _{контр,гр2} =0,0 844	Р _{контр,гр2} =0,1 799	Р _{контр,гр2} =0,3 331	Р _{контр,гр2} =0,4 068	Р _{контр,гр2} =0,3 155
	Р _{гр1,гр2} =0,73 24	Р _{гр1,гр2} =0,22 05	Р _{гр1,гр2} =0,20 49	Р _{гр1,гр2} =0,39 79	Р _{гр1,гр2} =0,37 22	Р _{гр1,гр2} =0,37 77

Статистически значимой разницы по плотности и жизнеспособности клеток в контрольной и опытных группах не выявлено.

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 миграции СККМ кролика с мембран отмечено, что уже через 24 - 48 часов фиксировалось появление единичных фибробластоподобных клеток на пластике непосредственно около образцов «Остеопласт», количество которых увеличивалось в процессе наблюдения. К 96 - 120 часам наблюдения клетки формировали субконфлюэнтный монослой (Рис. 12). Таким образом, СККМ кролика переносились 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.

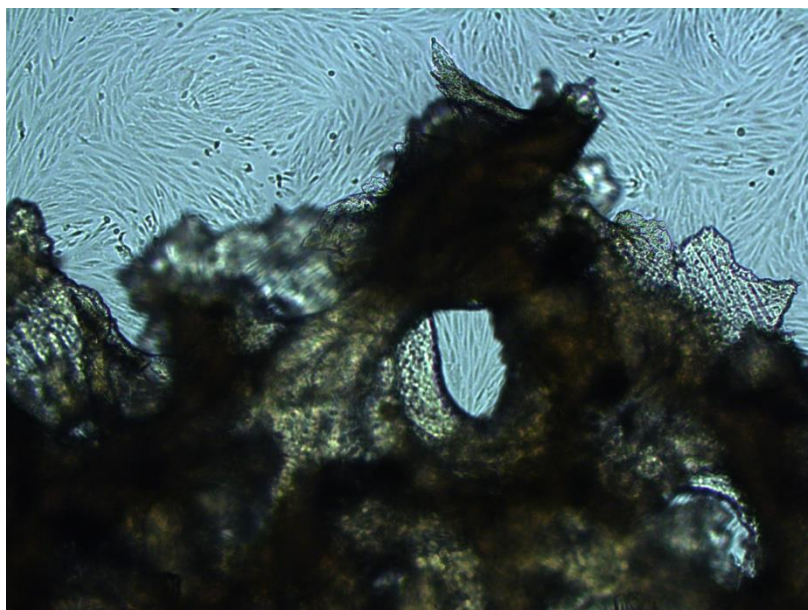


Рис. 12. Миграция СККМ кролика с матрицы «Остеопласт» и формирование субконфлюэнтного монослоя вокруг нее через 96 часов после переноса (Увеличение 100).

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. 13). Использование кальцеина (Рис.14,15) позволяло увидеть клетки типичной для СККМ веретеновидной формы на поверхности каркаса и подтверждало их жизнеспособность.

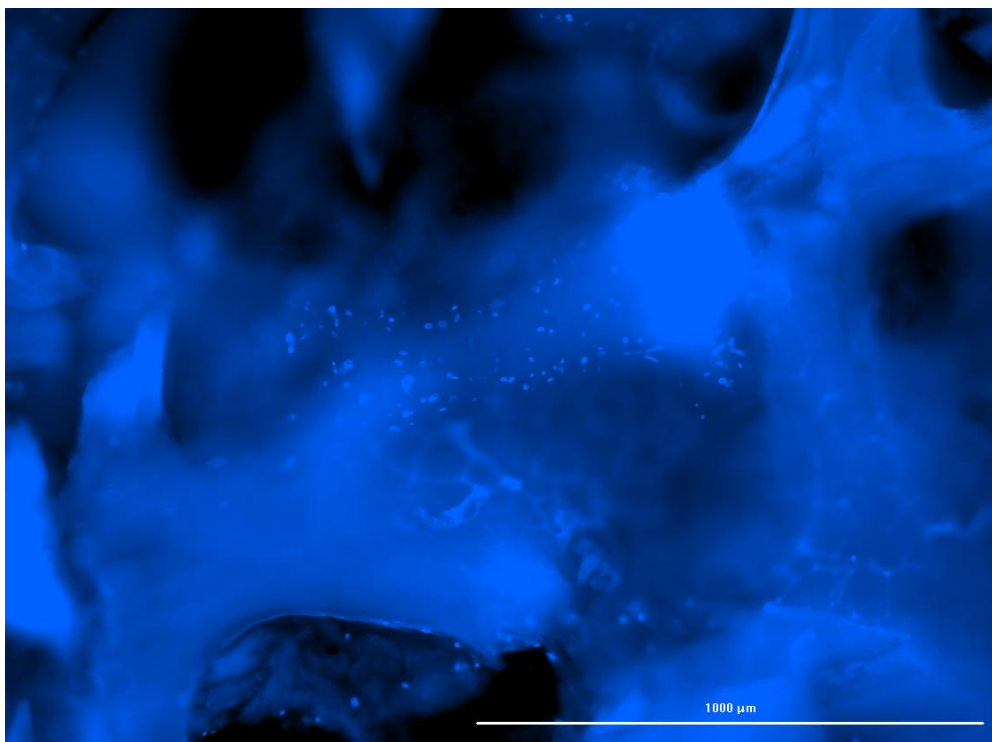


Рис. 13. СККМ кролика на матрице «Остеопласт» через 24 часа после пересева (Окраска Hoechst 3334. Увеличение 40).

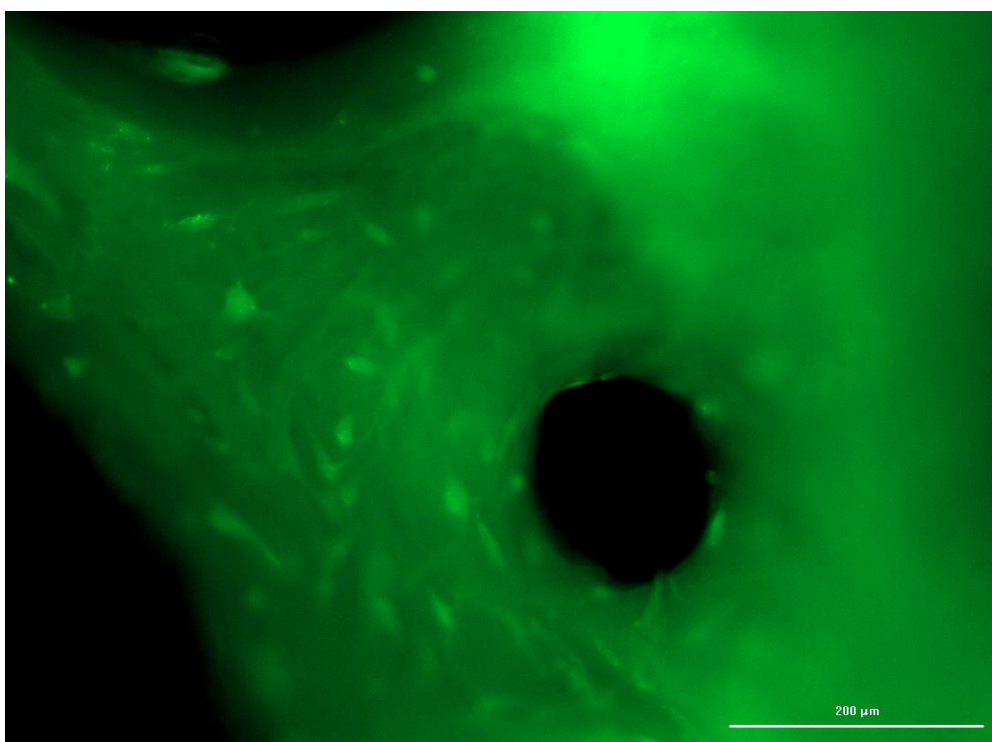


Рис. 14. СККМ кролика на матрице «Остеопласт» через 24 часа после пересева (Окраска Calcein, Увеличение 100).

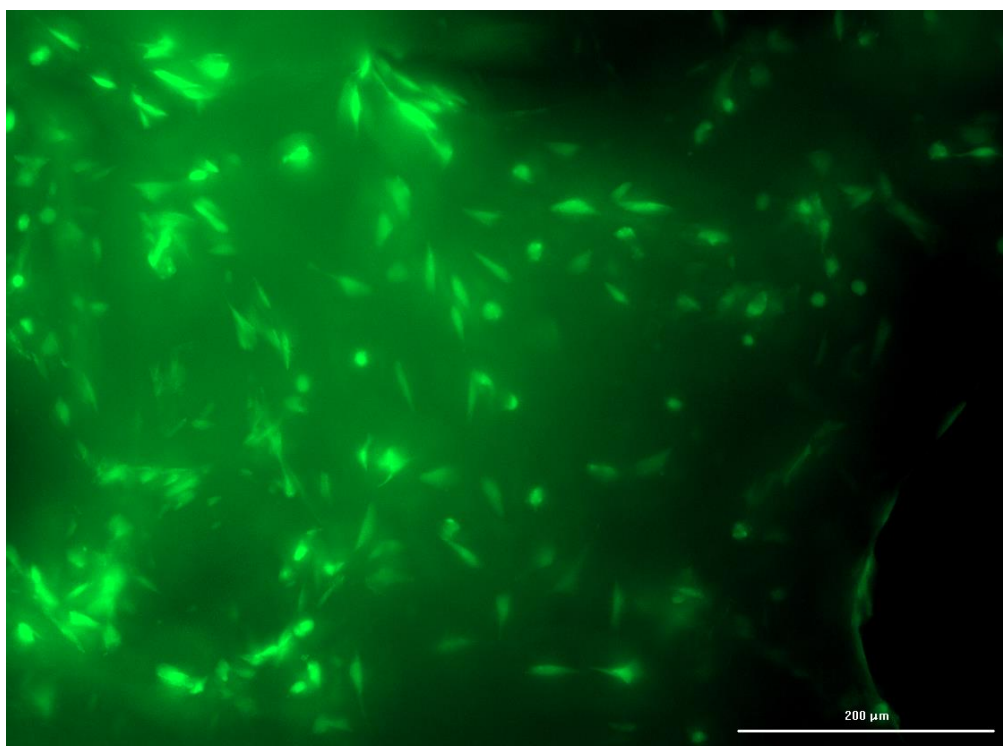


Рис. 15. СККМ кролика на матрице «Остеопласт» через 24 часа после пересева (Окраска Calcein. Увеличение 100).

Полученные результаты демонстрировали, 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.16). Применение прижизненной окраски кальцеином (Рис. 17, 18) демонстрировало, что на поверхности мембраны «Chondro Gide» СККМ кролика распластываются, сохраняя жизнеспособность и типичную фибробластоподобную форму.

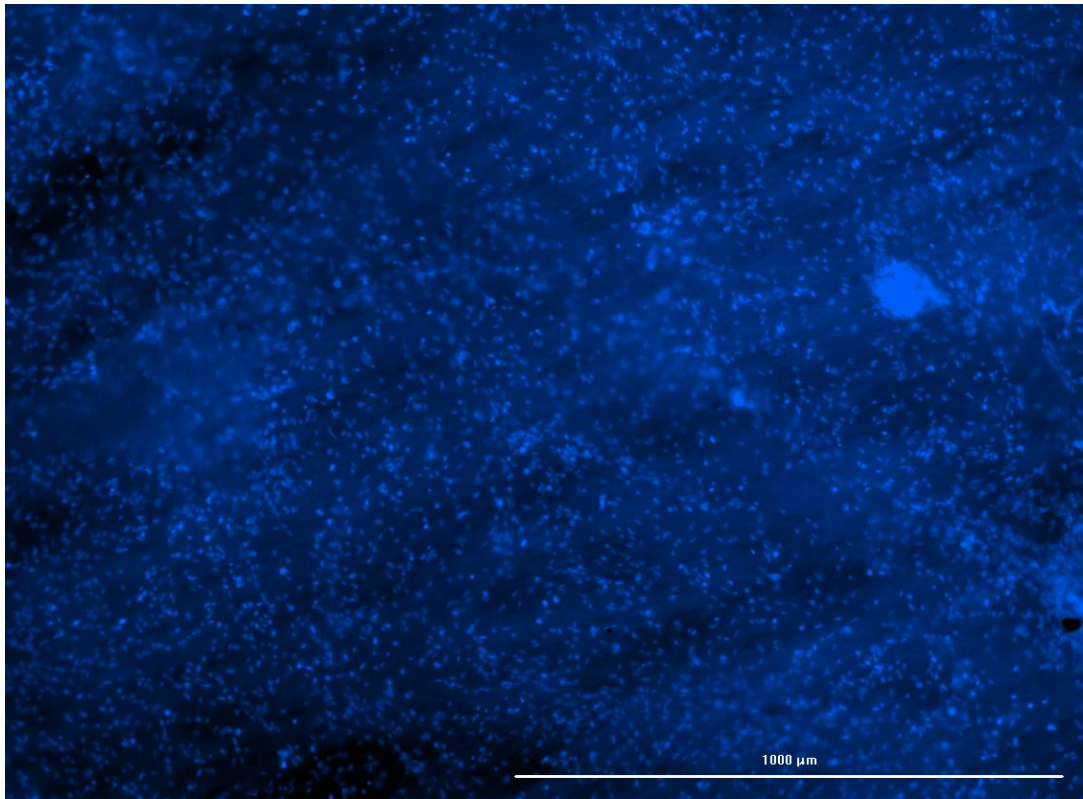


Рис. 16. СККМ кролика на мембране «Chondro Gide» через 24 часа после пересева (Окраска Hoechst 3334. Увеличение 40).

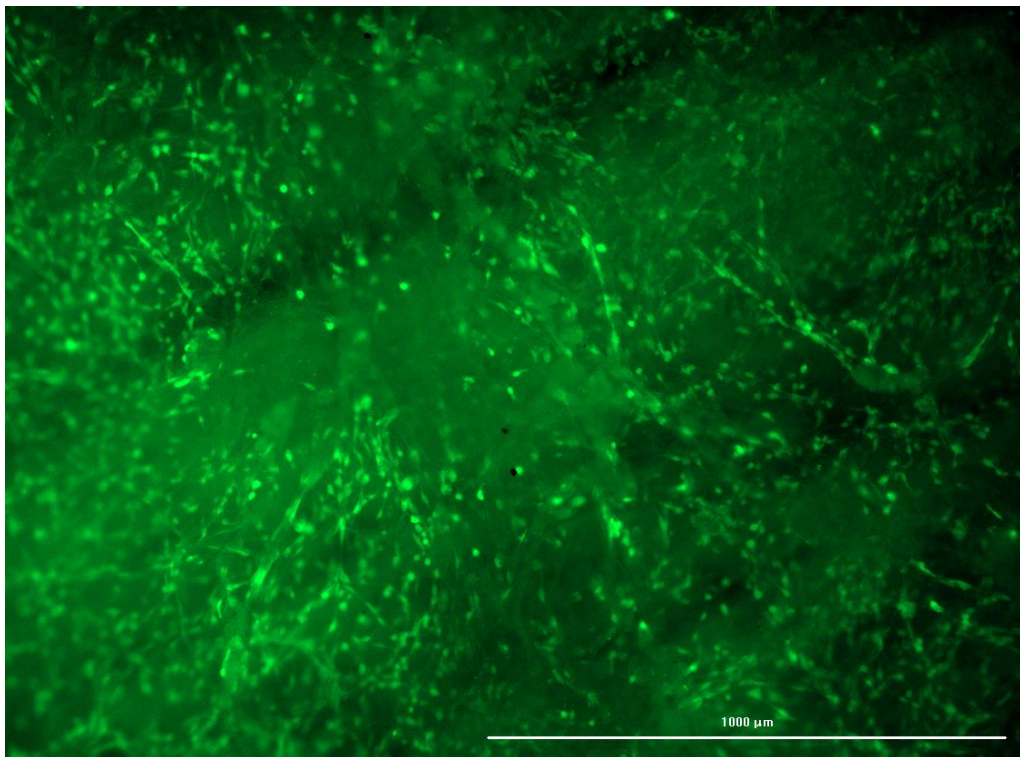


Рис.17. СККМ кролика на мембране «Chondro Gide» через 24 часа после пересева (Окраска Calcein. Увеличение 40).

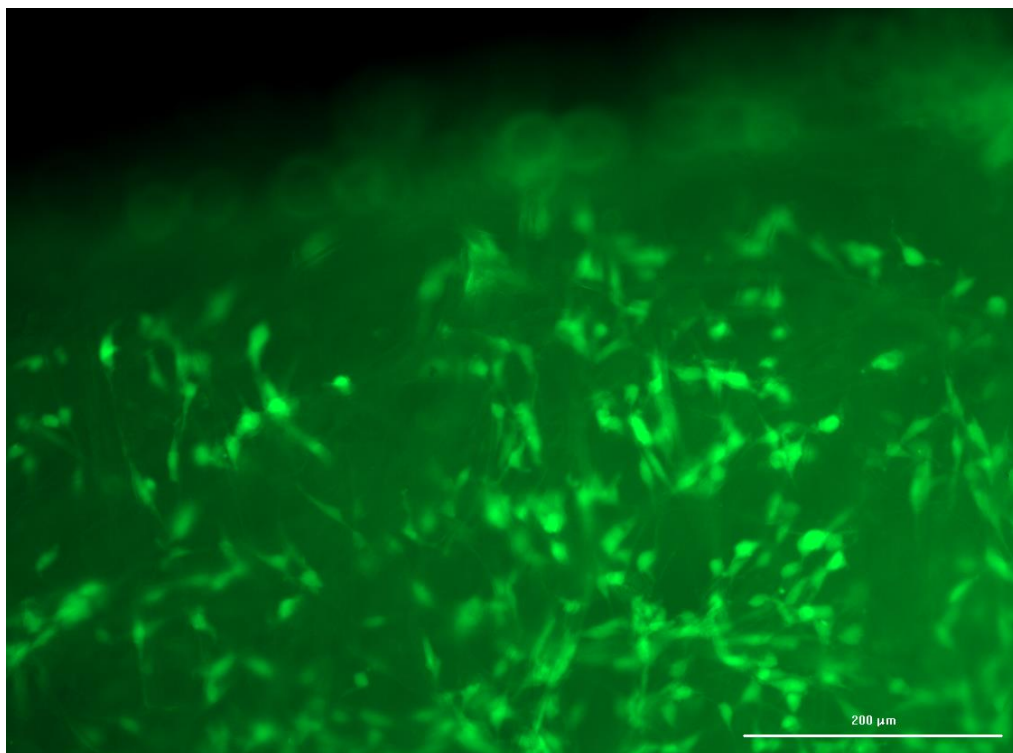


Рис.18. СККМ кролика на мембране «Chondro Gide» через 24 часа после пересева (Окраска Calcein. Увеличение 100).

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 распределению клеток, как по поверхности, так и в глубине пор.

В результате данного этапа экспериментальных исследований доказано, что использованные клетки отвечали критериям, характеризующим СККМ, и могли использоваться для изучения взаимодействия СККМ с различными структурами в экспериментах как *in vitro*, так *in vivo*. Обе исследованные матрицы не токсичны для СККМ кролика. Через 48 часов культивирования на матрицах клетки распределялись на их поверхности, сохраняли жизнеспособность и типичную морфологию.

Тип распределения СККМ на мембранах различен и зависит от их структуры: так «Остеопласт» имеет пористую поверхность, а «Chondro Gide» гомогенную.

СККМ кролика при культивировании *in vitro* способны мигрировать на поверхность пластика с матрицы «Остеопласт», сохраняя типичную морфологию и пролиферативную активность. Выраженной миграции клеток с мембраны «Chondro Gide» не выявлено.

Подготовка комплекса коллагеновая матрица + СККМ к исследованию на животных проводилась аналогично подготовке к исследованию *in vitro*, что позволяло считать применяемые для эксперимента на животных образцы совпадающими по характеристикам с образцами, проанализированными *in vitro*.

4.2. Макроскопическая оценка биопсийного материала

Осуществлялась макроскопическая оценка изъятых образцов тканей.

Контрольная группа

У всех животных контрольной группы наблюдался округлый дефект 3,3 мм ниже уровня окружающих тканей с желтоватым оттенком (Рис. 19, 20).



Рис. 19. Зона дефекта суставной поверхности. Контрольная группа 3 мес.



Рис. 20. Зона дефекта суставного хряща. Контрольная группа 6 мес.

Группа Опыт 1

(БМКП «СККМ + Chondro Gide»).

У животных группы Опыт 1 макроскопически визуализировался округлый шероховатый участок суставной поверхности внутреннего мыщелка бедренной кости до 3,3 мм в диаметре несколько ниже уровня окружающих тканей (Рис. 21).



Рис. 21. Зона восстановленного дефекта суставной поверхности. БМКП
СККМ + «Chondro Gide» 3 мес.

На сроке наблюдения 6 месяцев у животных группы Опыт 1 макроскопически отчетливо визуализировался округлый шероховатый участок суставной поверхности внутреннего мыщелка бедренной кости неправильной формы несколько ниже уровня окружающих тканей (Рис. 22).



Рис. 22. Зона восстановленного дефекта суставной поверхности. БМКП СККМ + «Chondro Gide» 6 мес.

Группа Опыт 2

(БМКП «СККМ + Остеопласт»).

У животных группы Опыт 2 макроскопически неотчетливо визуализировался округлый участок суставной поверхности внутреннего мыщелка бедренной кости до 3,3 мм в диаметре, бело – голубоватого цвета на уровне окружающих тканей (Рис. 23).



Рис. 23. Зона восстановленного дефекта суставной поверхности. БМКП СККМ + «Остеопласт».

При исследовании на сроке 6 месяцев у животных группы Опыт 2 макроскопически границы дефекта сливаются с окружающим суставным

хрящом, отмечаются участки бело-голубоватых вкраплений внутреннего мыщелка бедренной кости (Рис. 24).



Рис. 24. Зона восстановленного дефекта суставного хряща. БМКП СККМ + «Остеопласт» 6 мес.

Таким образом, оценивая макроскопическую картину области сформированного дефекта через 6 месяцев после операции, отмечено наиболее полное восстановление ткани в группе Опыт 2 (БМКП СККМ + «Остеопласт») при этом макроскопически нет четкой границы между зоной сформированного дефекта и окружающим суставным хрящом.

4.3. Анализ данных морфометрического метода исследования.

При морфометрическом исследовании области дефекта на сроке наблюдения 3 месяца отмечалось отсутствие восстановления дефекта в контрольной группе, исключающее возможность проведения морфометрии хряща в центральной зоне дефекта и последующую статистическую обработку данных. В опытных группах наблюдалось частичное восстановление области дефекта, КВ в группе Опыт 1 составил $0,57 \pm 0,05$, в

группе Опыт 2 этот показатель был равным $0,79 \pm 0,04$ ($P_{\text{Опыт1,2}} = 0,0001$) (Рис. 25).

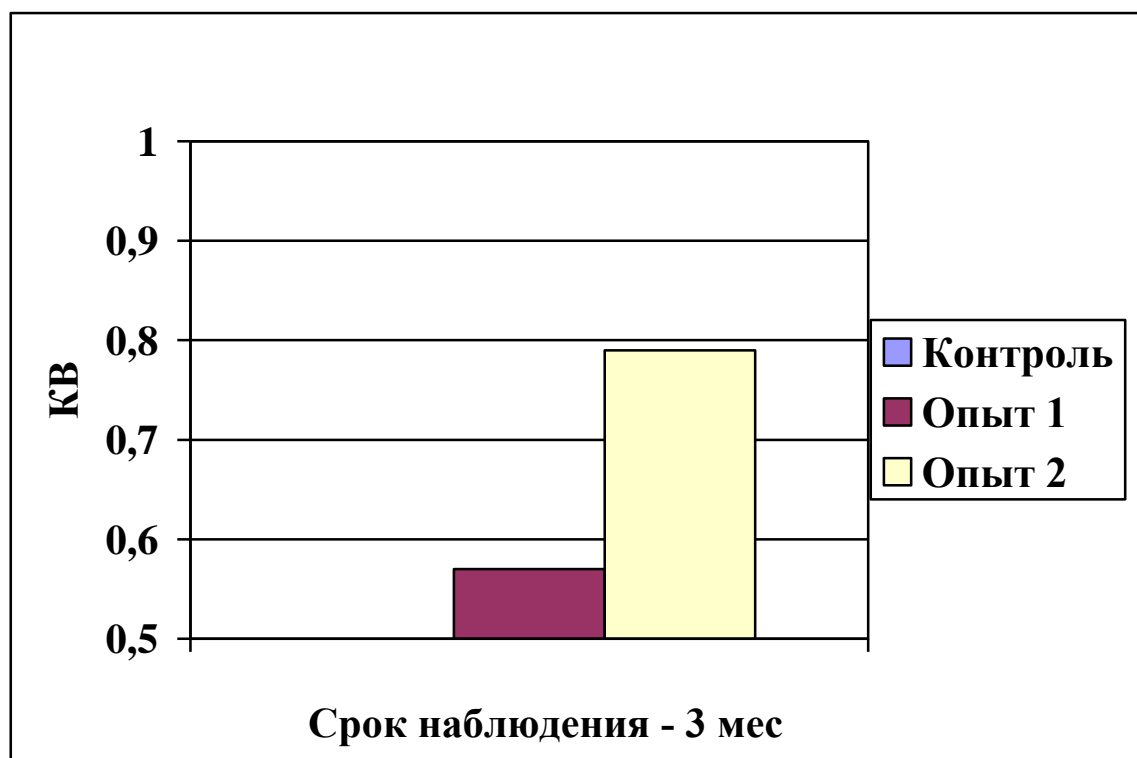


Рис. 25. Сравнение коэффициента восстановления в группах через 3 месяца.

Таким образом, через 3 месяца наблюдений в каждом исследуемом срезе каждой группы KB был менее 0,85, исход восстановления ограниченных повреждений суставного хряща расценивался как неблагоприятный.

Через 6 месяцев наблюдений в контрольной группе отмечено частичное восстановление области дефекта, KB составил $0,62 \pm 0,06$. В группе Опыт 1 KB был равным $0,79 \pm 0,07$, в группе Опыт 2 KB находился на уровне $0,88 \pm 0,02$ ($P < 0,03$ с учетом множественных сравнений) (Рис. 26).

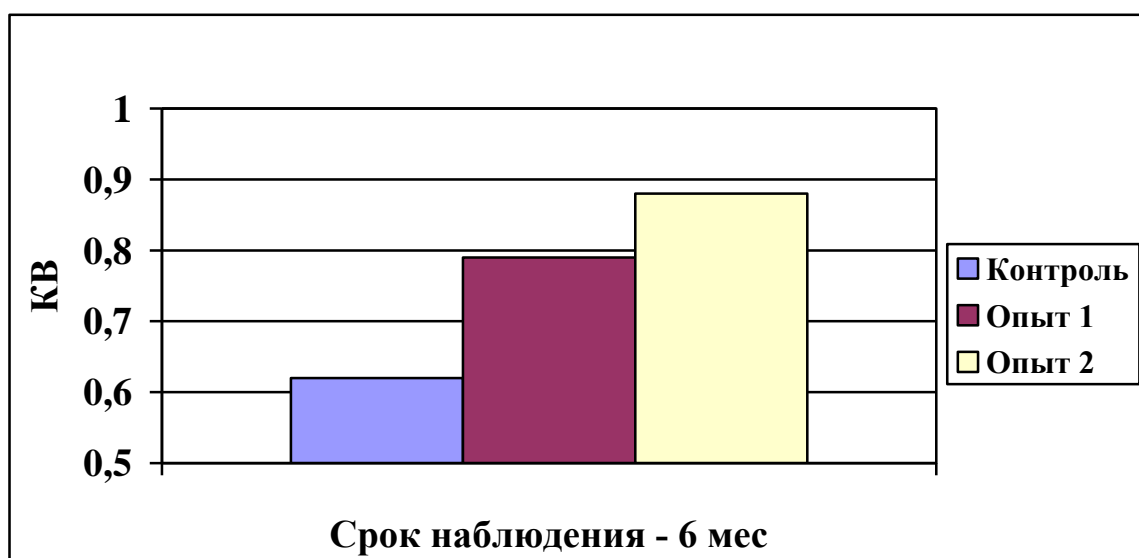


Рис. 26. Сравнение коэффициента восстановления в группах через 6 месяцев.

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.

Сравнивая результаты морфометрического исследования на протяжении всего эксперимента, наблюдается раннее начало репаративных процессов в опытных группах при замещении сформированных дефектов биомедицинскими клеточными продуктами, однако более высокие показатели отмечаются в группе Опыт 2. (Рис. 27).

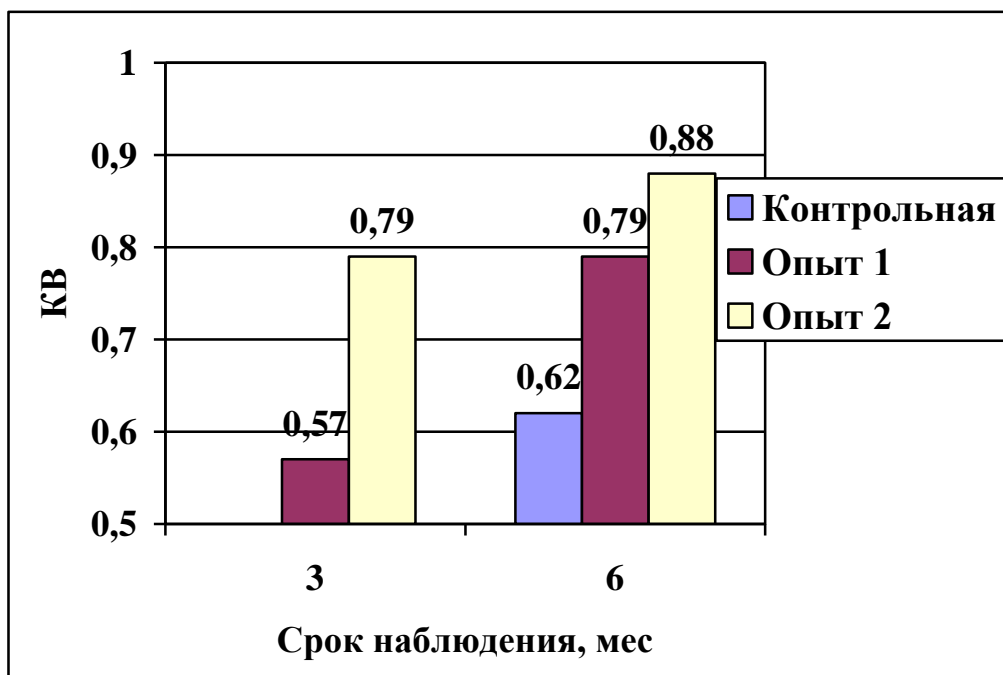


Рис. 27. Сравнение коэффициента восстановления в группах в динамике.

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.

4.4. Статистическая оценка результатов эксперимента.

Через 6 месяцев наблюдений в каждом исследуемом срезе контрольной группы KB 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. Данные представлены в таб. 7.

Таблица 7.

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, данные представлены в таб. 8.

Таблица 8.

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	χ^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, полученные данные 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.

4.5. Анализ данных гистоморфологического метода исследования.

При оценке микроскопической картины 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.

4.5.1. Морфологическая характеристика ткани восстановленного дефекта суставного хряща без замещения БМКП. 3 месяца после операции.

При гистологическом исследовании одного из краёв дефекта определялись костные структуры с правильно ориентированными костными балками, между которыми располагался миелоидный костный мозг (Рис. 28). К костным балкам примыкала плотная волокнистая соединительная ткань с неравномерным количеством клеточных элементов, которая была тесно сопряжена с узкой полоской хрящеподобной ткани, которая содержала хондробласты с довольно крупными ядрами с оптически пустой цитоплазмой, плавно переходящей в узкую полоску обызвествлённой хрящеподобной ткани (Рис. 29). Другой край дефекта (с противоположной стороны) был представлен мало измененной костной тканью.

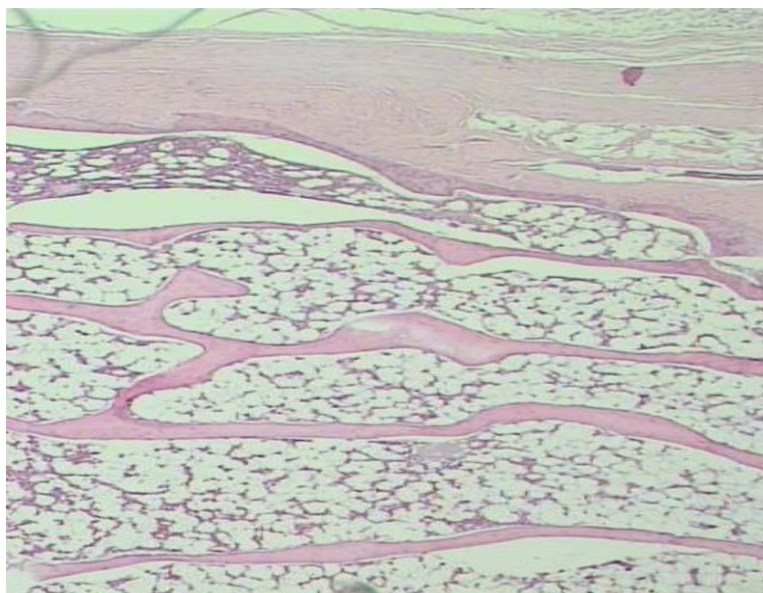


Рис. 28. Ориентированные костные балки, окруженные миелоидным костным мозгом в костно-мозговом пространстве (Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение 50).

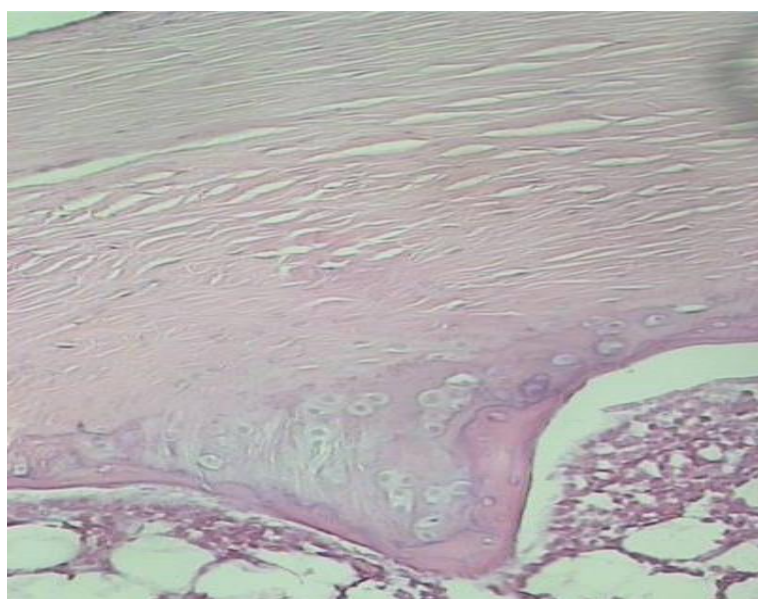


Рис.29 Зона энхондрального остеогенеза (Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение 200).

Центральная зона представлена ретикуло-фиброзной тканью с участками плотно-волокнистой соединительной ткани, в основании которой наблюдалось формирование грубогубчатой костной ткани с небольшими

островками энхондрального остеогенеза. (Рис.30). Со стороны костномозгового пространства имеется участок остеогенеза с очагами новообразованных слабо базофильных костных балок, переходящих в грубогубчатую костную ткань, по краям которой расположены остеобласты (Рис.31).

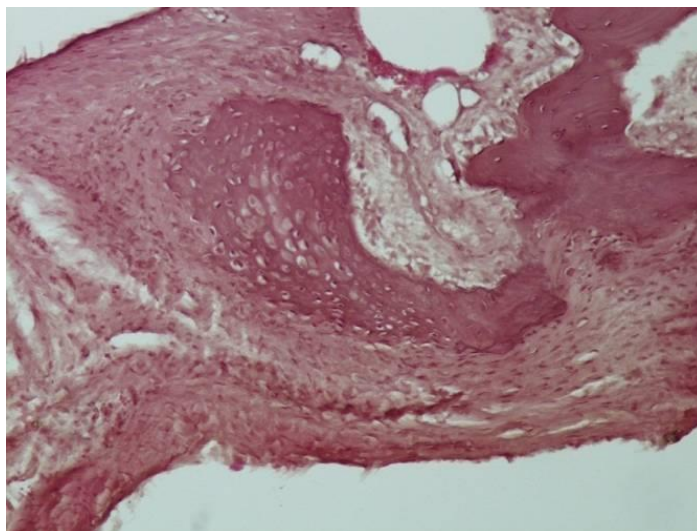


Рис.30. Центральная часть дефекта. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 20.)

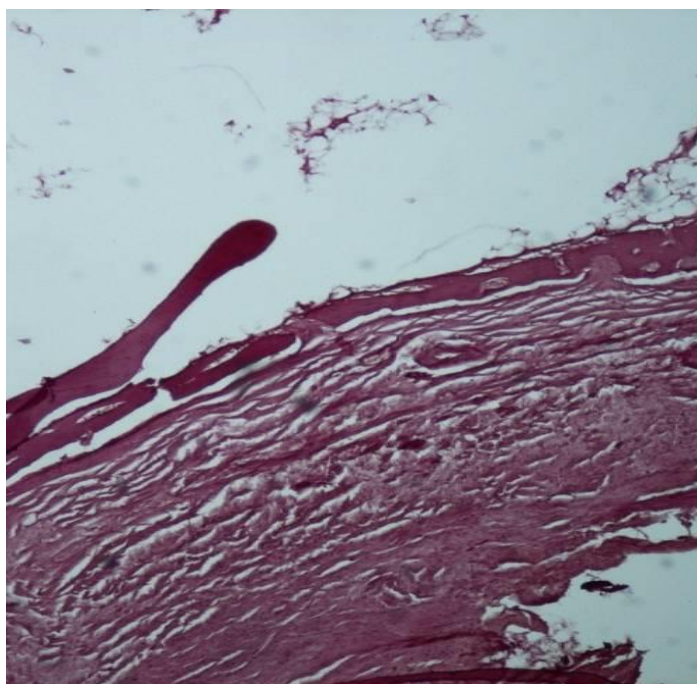


Рис. 31. Образование костных балок в зоне дефекта. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 20).

Анализ результатов исследования:

К 3 месяцам после формирования дефекта в контрольной группе в краях дефекта возникала реактивная перестройка костной ткани, окружающей зону дефекта. Со стороны костно-мозгового пространства наблюдалось образование «молодых» костных балок. Центральная зона дефекта представлена островками энхондрального остеогенеза, формирующимися костными балками с участками ретикуло-фиброзной ткани. Формирование гиалинового хряща отсутствует.

4.5.2. Морфологическая характеристика ткани восстановленного дефекта суставного хряща без замещения БМКП. 6 месяцев после операции.

При морфологическом исследовании материала через 6 месяцев костные края дефекта заметно утолщаются, становятся многоклеточными за счёт энхондрального остеогенеза как с одного из краев дефекта, так и с другого, приобретая грубогубчатое строение (Рис. 32,33)



Рис. 32. Край дефекта Реактивное утолщение губчатой костной ткани.
(Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).

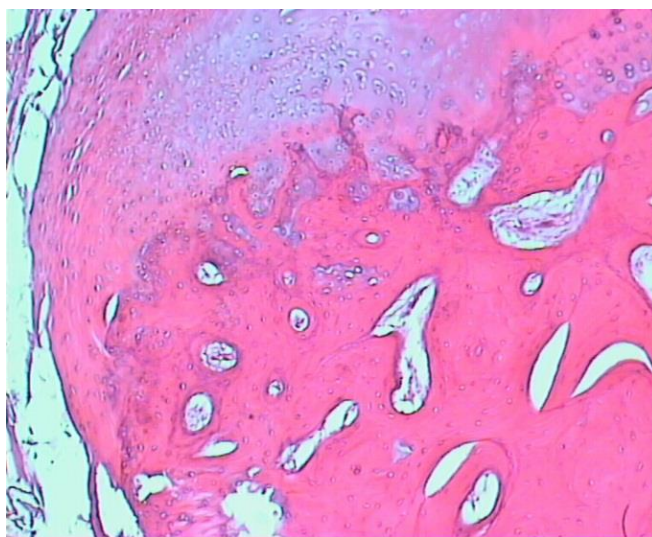


Рис.33. Противоположный край дефекта. (Окраска гематоксилин - эозин.
Увеличение 100).

Со стороны краев дефекта происходит активное формирование костных структур (Рис.34,35).

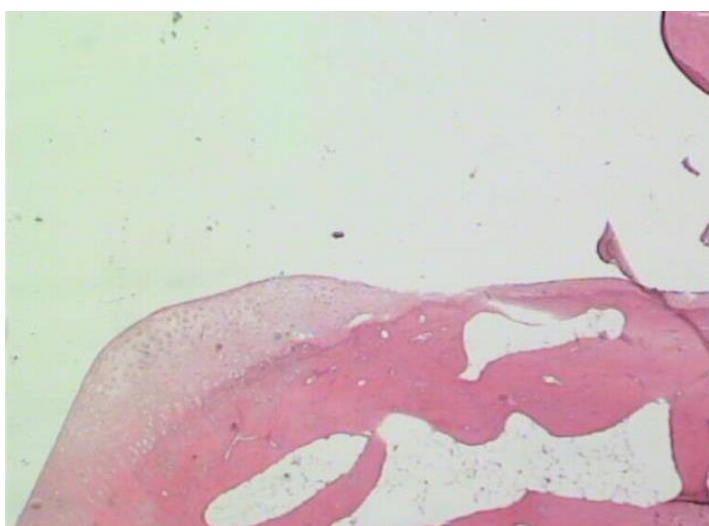


Рис. 34. Край дефекта. Участки энхондрального остеогенеза. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 50).

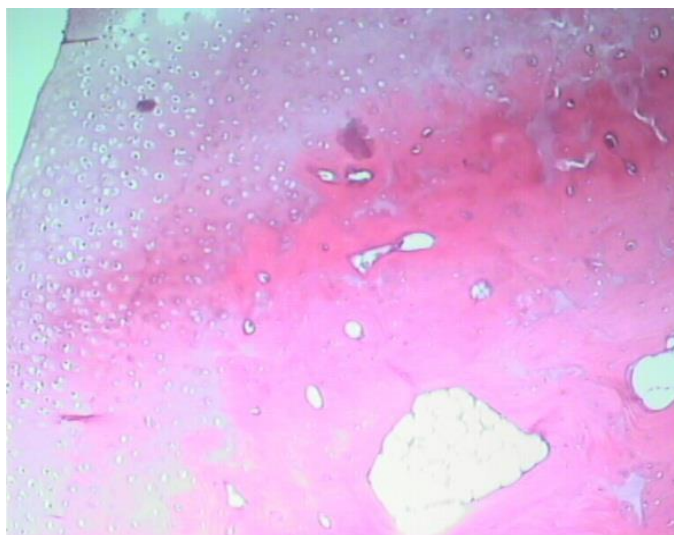


Рис. 35. Формирование костных структур (Интенсивно розовый цвет).
(Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение 50).

При гистологическом исследовании в зоне предполагаемого дефекта элементы ткани гиалинового хряща были представлены мелкими островками, преимущественно с краевым их расположением относительно центральной зоны дефекта. Наличие широкого слоя клеток не отмечено (Рис. 36). 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.

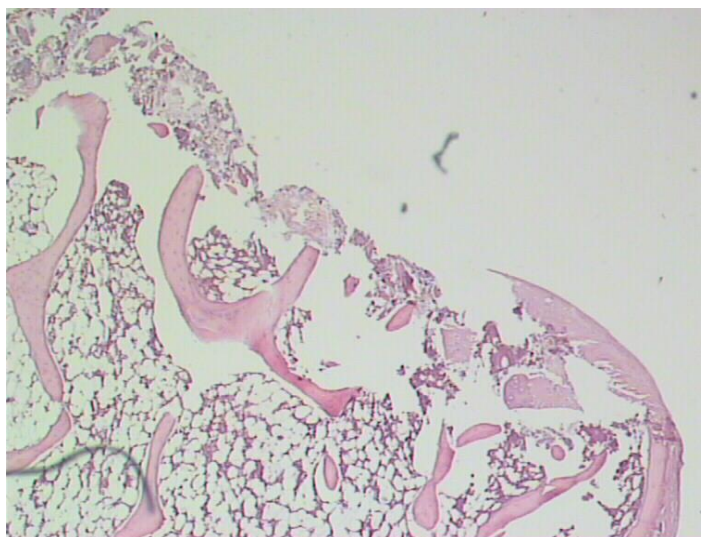


Рис. 36. Центральная зона дефекта. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 50).

Анализ результатов исследования:

К 6 месяцам края дефекта частично выполнены склерозированной костной тканью. В центральной зоне наблюдалось неполное восстановление костной и хрящевой ткани, хрящевая пластинка визуальнo тоньше интактной хрящевой пластинки зон, окружающего суставного хряща.

4.5.3. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью БМКП СККМ + «Chondro Gide». 3 месяца после операции.

При гистологическом исследовании края дефекта выполнены костной тканью разной степени зрелости, примыкающей к участкам сохранного гиалинового хряща. С одной из сторон дефекта отмечается активная пролиферация хрящевой ткани с заметным количеством хрящевых клеток с крупными округлыми ядрами (Рис. 37).

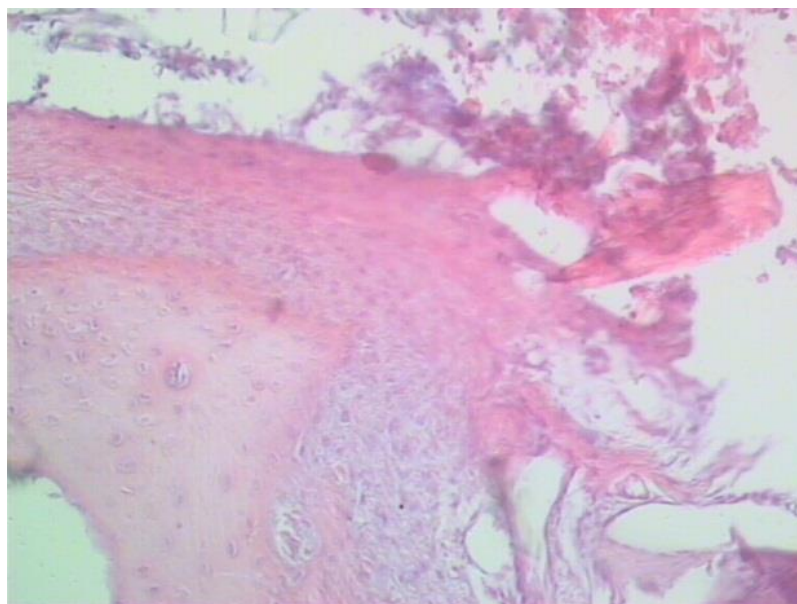


Рис. 37. Край дефекта с пролиферацией хрящевых клеток. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

Через три месяца наблюдения зона дефекта выполнена либо хаотично расположенными хрящевыми клетками, либо клетками, формирующими мелкие группы. Субхондральная костная пластинка не просматривалась.

В зоне сохранного суставного хряща имелся участок из пролиферирующих хрящевых клеток с фокусами крупных клеток, наличием гиперхромных ядер, а также очагов энхондрального остеогенеза (Рис. 38,39).

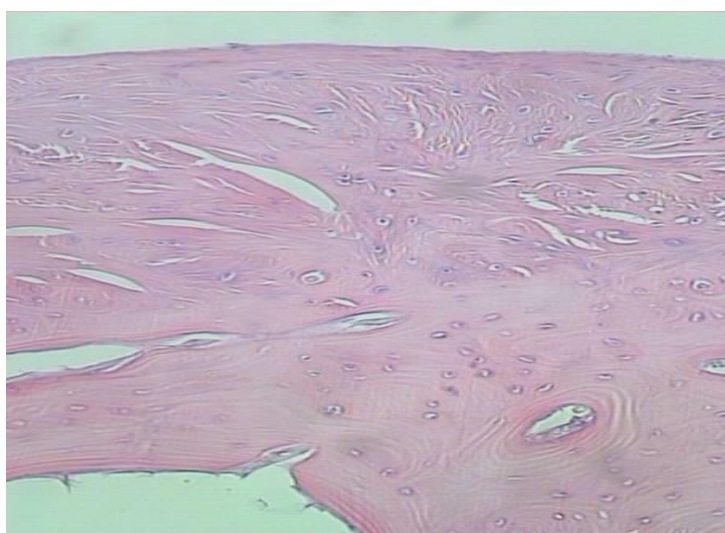


Рис. 38. Формирующаяся костная ткань. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

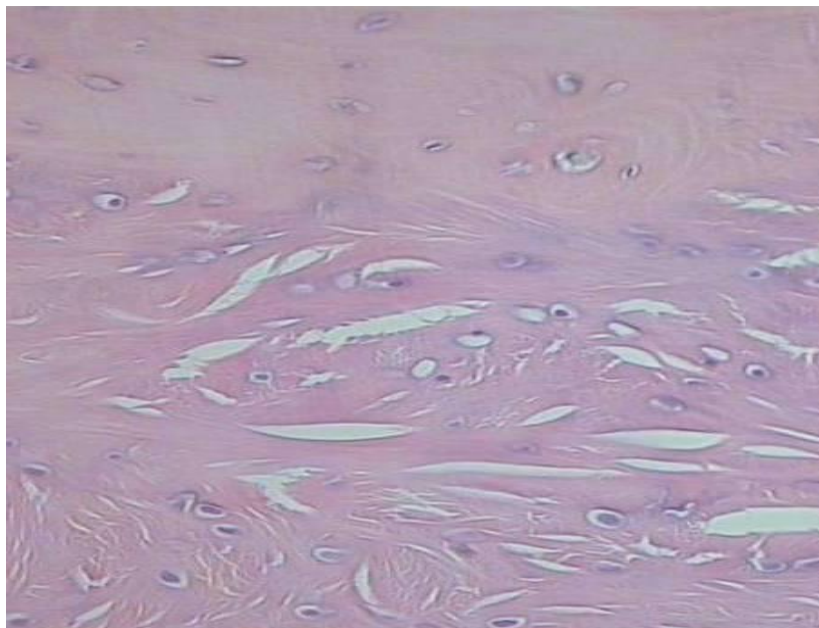


Рис. 39 Формирующаяся костная ткань. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 400).

В некоторых участках наряду с фокусами волокнистой хрящевой ткани имеются очажки из ткани гиалинового хряща. Верхний край формирующейся хрящевой пластинки неровный (Рис. 40, 41).

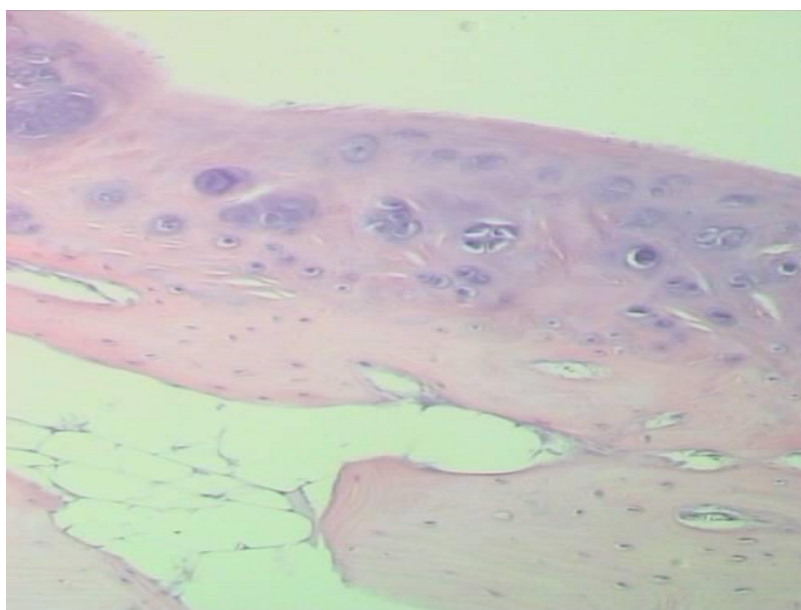


Рис. 40. Зона дефекта с формирующейся хрящевой пластинкой. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

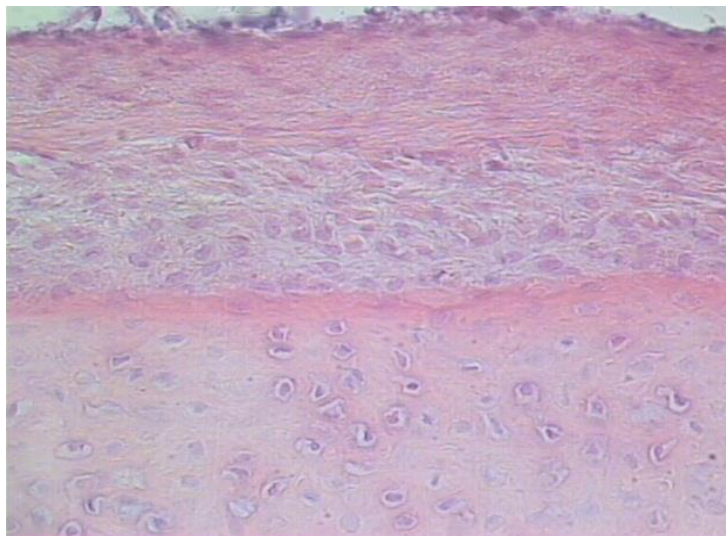


Рис. 41. Послойное строение зоны дефекта с формированием хряща с крупными хондроцитами. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 400).

Анализ результатов исследования:

К 3 месяцам после формирования дефекта суставного хряща со стороны краев последнего отмечалась достаточно активная пролиферация костной ткани с островками энхондрального остеогенеза, а также фокусами пролиферации хрящевых клеток, формирующих включения гиалиноподобной хрящевой ткани. В центральной зоне дефекта отмечалось формирование гиалиноподобной хрящевой ткани с большим количеством клеток типа хондробластов с крупными округлыми ядрами. Часть области дефекта выполнена грубогубчатой костной тканью. Субхондральная костная пластинка не восстановлена.

4.5.4. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью БМКП СККМ + «Chondro Gide». 6 месяцев после операции.

Края дефекта выполнены участками сформированного гиалинового хряща и подлежащей костной пластинкой (Рис. 42).

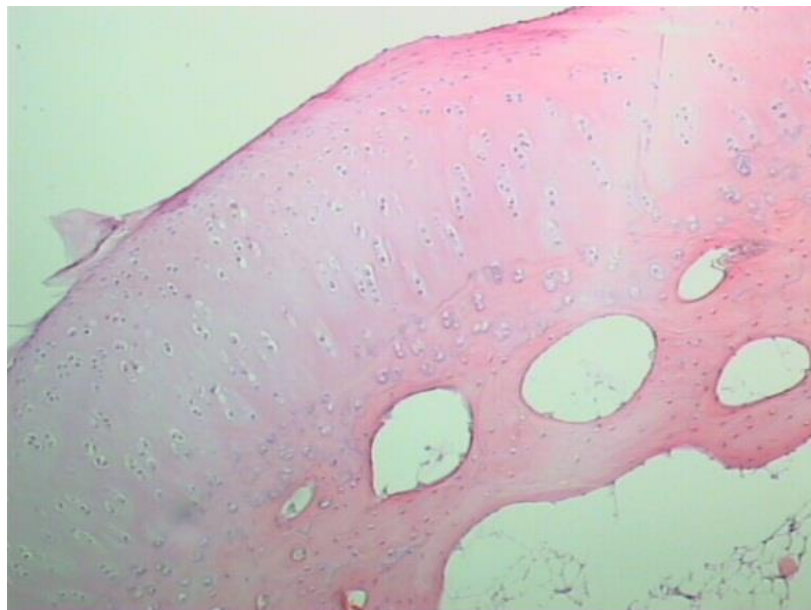


Рис. 42 Зона интактного хряща, расположенного на границе с дефектом. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 50).

Центральная зона дефекта представлена мозаично расположенными участками разной степени зрелости гиалинового хряща с хаотично расположенными крупными, двухъядерными хондроцитами с гиперхромными ядрами. Надхрящница утолщенная, с гнездным (клоновым) расположением хрящевых клеток. Субхондральная костная пластинка не просматривалась. Костные балки спонгиозы ориентированы, богатоклеточные, с очаговым склерозом субламинарной зоны; в просвете костно-мозговых пространств-миелоидный костный мозг (Рис. 43, 44, 45, 46, 47, 48).

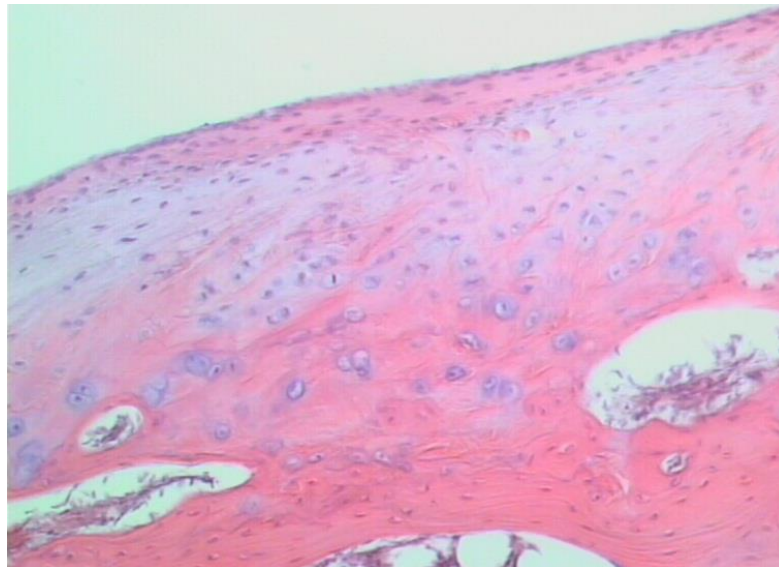


Рис. 43. Зона дефекта с утолщенной надхрящницей и гнёздным расположением хрящевых клеток. (Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение 200).

В зоне повреждения выявлялись крупные хондроциты в состоянии некробиоза (с опустошёнными лакунами), а также участки пролиферирующих хондроцитов.



Рис. 44 Гиалиновый хрящ с хаотично расположенными двуядерными хондроцитами. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).



Рис. 45. Гиалиновый хрящ с хаотично расположенными двуядерными хондроцитами. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).

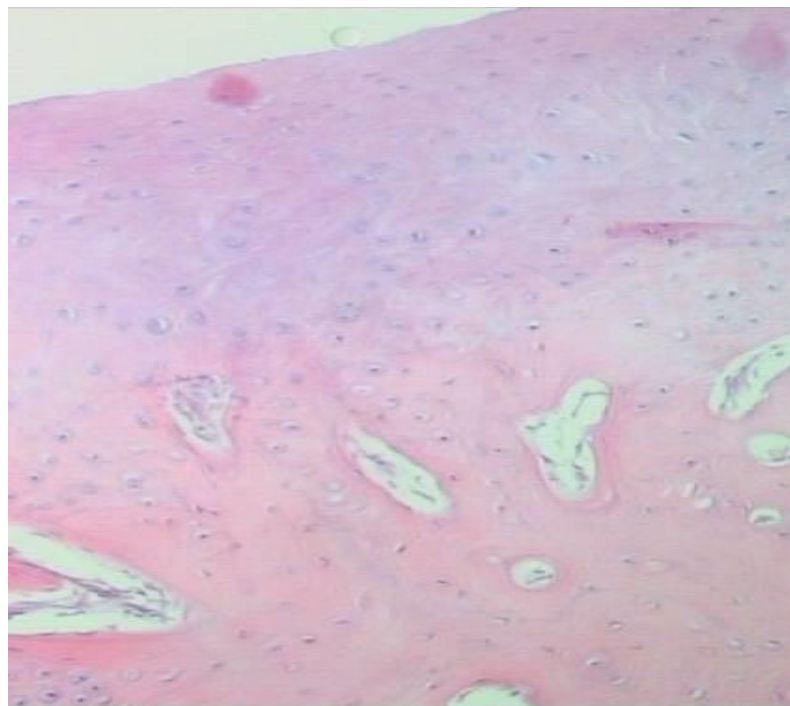


Рис. 46. Вновь образованный гиалиновый хрящ. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

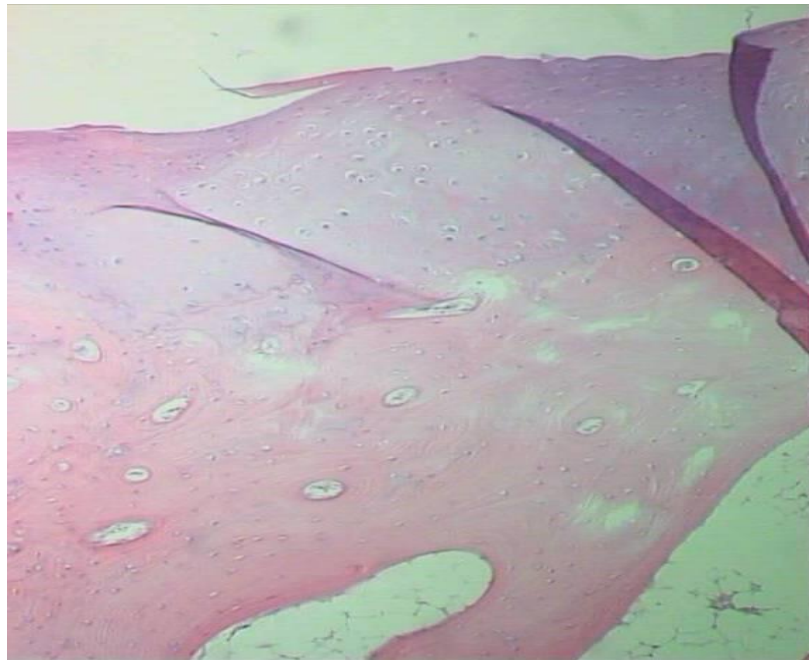


Рис. 47. Зона перестройки хряща с редким расположением хрящевых клеток, очагами некроза, склерозом субламинарной зоны. Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200.

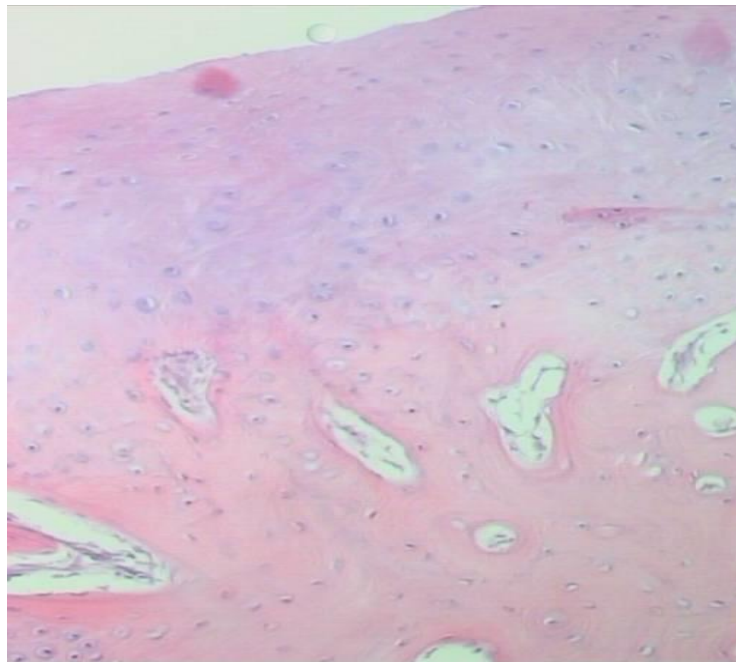


Рис. 48. Зона перестройки хряща. Поверхность хряща волнообразная с очагом некробиоза, участками обызвествления хрящеподобной ткани,

фокусами склероза субламинарной зоны. (Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение 100).

Несмотря на восстановление хрящевой ткани в зоне дефекта, во вновь образованном гиалиновом хряще не отмечалось адекватного замещения структуры с обозначением зональной организации. Вновь образованный хрящ уступал по толщине и архитектонике предшествующей хрящевой ткани и характеризовался наличием фокусов волокнистой хрящевой ткани на фоне формирующегося гиалинового хряща с более редко расположенными клеточными элементами, мелкими очажками некроза в зоне формирования хряща в сочетании с очаговым склерозом субламинарной зоны (Рис. 49, 50).



Рис. 49. Формирование гиалинового хряща. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 400).

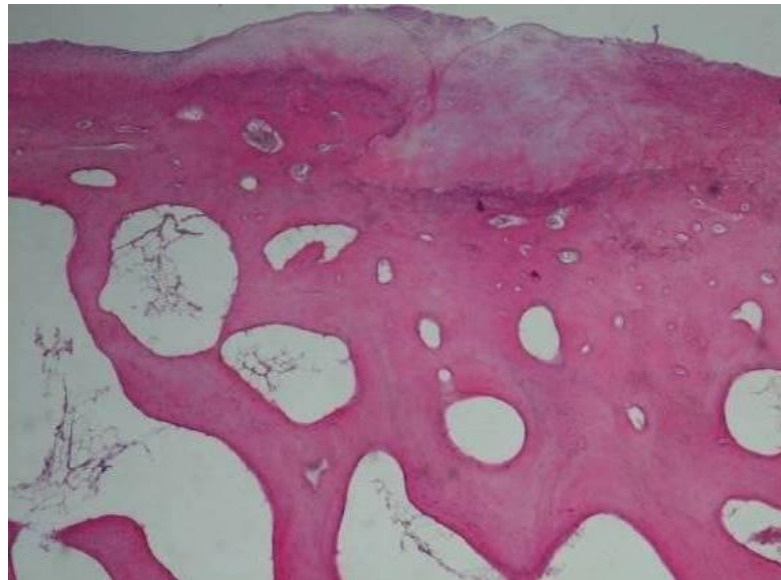


Рис. 50. Формирование гиалинового хряща. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 400).

Анализ результатов исследования:

К 6 месяцам края дефекта выполнены участками сформированного гиалинового хряща и подлежащей костной пластинкой. Сформированная зона дефекта представлена участками неравномерной плотности костной ткани, а также участками вновь сформированного гиалинового хряща с фокусами ткани волокнистого хряща. Количество хрящевых клеток меньше по сравнению с образцами, полученными через 3 месяца наблюдения, расположены они по-прежнему хаотично. 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.

4.5.5. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью БМКП СККМ + «Остеопласт». 3 месяца после операции.

В краях дефекта со стороны интактного гиалинового хряща отмечается его некоторое утолщение с наличием в этой зоне скоплений довольно крупных округлой формы хрящевых клеток, формирующих местами фокусы в виде гнезд из 4-5 клеток.

Структура зоны дефекта устроена по типу «слоёного пирога»: волокнистая соединительная ткань, хрящевая ткань, богатая клетками, грубогубчатая костная ткань, плотная склерозированная губчатая ткань. Центральная его часть представлена широким слоем хрящевой ткани, с присутствием крупных округлых клеток (хондробластов), которые в части полей зрения формировали гнезда из 3-4 клеток, окруженных слабо базофильным матриксом (Рис. 51, 52 53).



Рис. 51. Зона дефекта (центральная часть) с широким слоем хрящевой ткани с крупными хондробластами, грубогубчатой костной тканью. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).

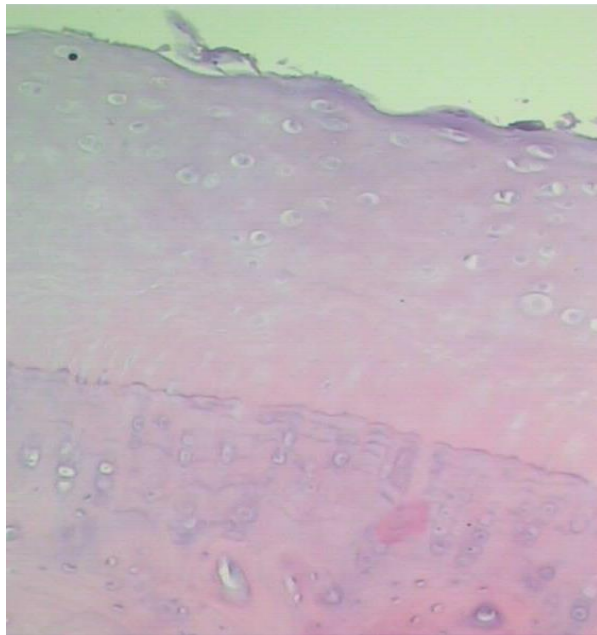


Рис. 52. Восстановление дефекта в виде появления гиалиноподобной хрящевой ткани с крупными клетками, формирующими изогенные группы. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

Субхондральная костная пластинка не просматривается. В более глубоких отделах субламинарной зоны происходит формирование грубогубчатой костной ткани с островками энхондрального остеогенеза наличием остеоцитов, расположенных в расширенных лакунах (Рис. 53).

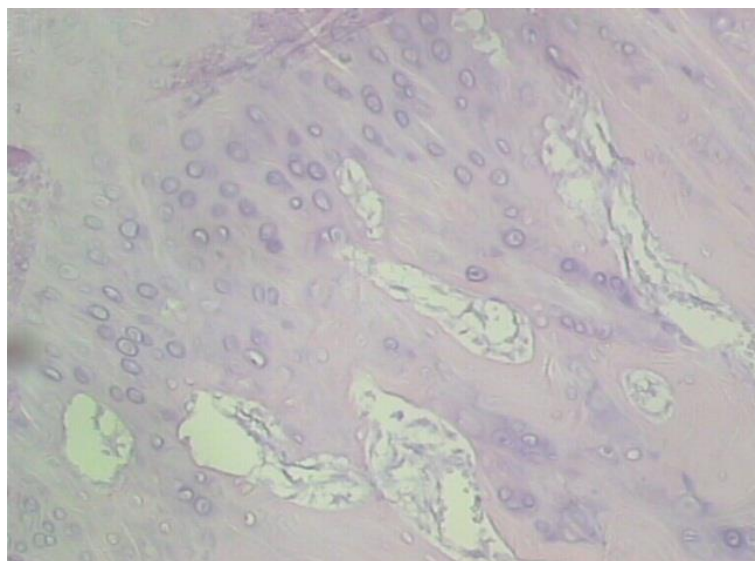


Рис. 53. Формирование грубо-губчатой костной ткани. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).

Прилегающий к зоне дефекта участок в виде структуры плотно-волокнутой упорядоченной ткани переходит в участок вновь образованного гиалинового хряща (Рис. 54).

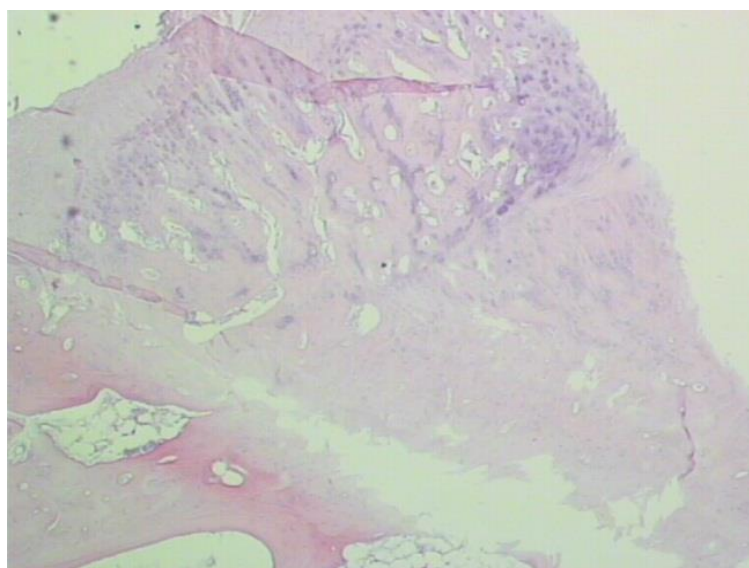


Рис. 54. Зона дефекта. Вновь сформированная губчатая костная ткань с участками обызвествляющейся хрящевой ткани. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).

Анализ результатов исследования:

К 3 месяцам после формирования дефекта суставного хряща в области его краев имела место реактивная перестройка хрящевой ткани, примыкающей к зоне дефекта в виде утолщения краевых отделов интактной хрящевой пластинки с появлением крупных округлых клеток с округлыми крупными ядрами типа хондробластов. Центральная часть представлена широким слоем хрящевой ткани, с присутствием крупных округлых клеток (хондробластов), которые в части полей зрения формировали гнезда из 3-4 клеток, окруженных слабо базофильным матриксом. Со стороны костно-мозгового пространства наблюдалось образование «молодых» костных балок

с формированием грубогубчатой костной ткани с широкими лакунами и остатками обызвествлённого гиалинового хряща.

4.5.6. Морфологическая характеристика ткани дефекта восстановленного с помощью БМКП СККМ + «Остеопласт». 6 месяцев после операции.

Края дефекта представлены участками хрящевой ткани с неровным краем, хрящевые клетки преимущественно с гиперхромными ядрами. Формирования субхондральной костной пластинки не отмечается (Рис. 55, 56).

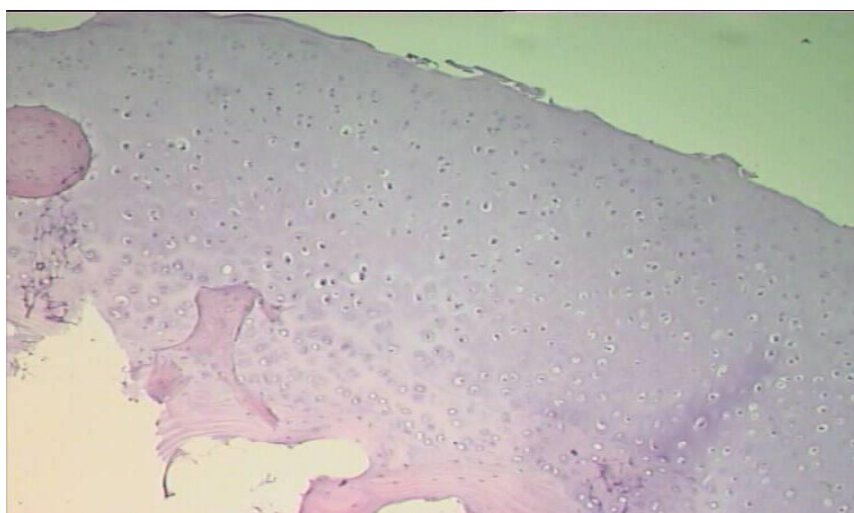


Рис. 55. Пограничная зона дефекта. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 100).

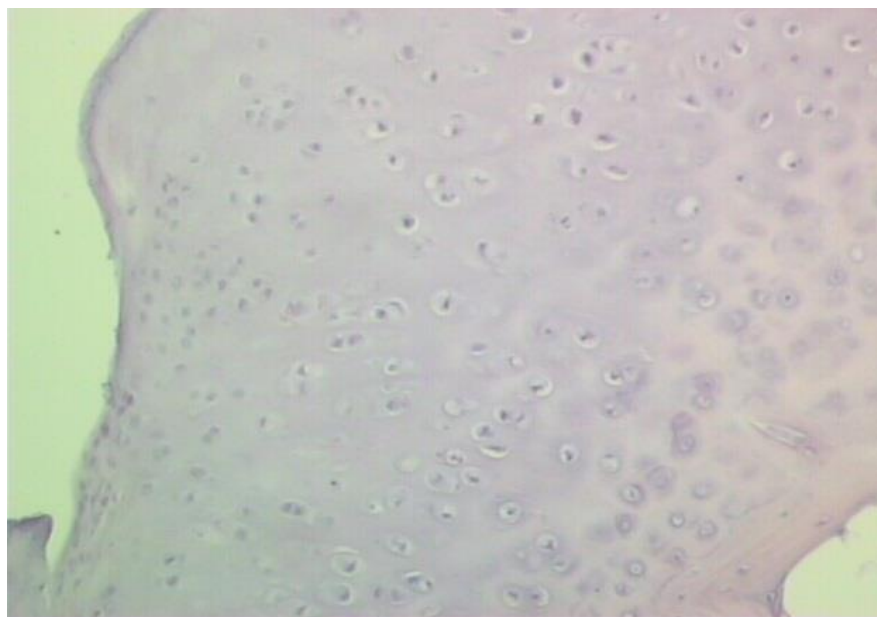


Рис. 56. Гиалиновый хрящ с волнообразной поверхностью с гиперхромными ядрами. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

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, а также встречалось большое количество крупных хондроцитов с одним или двумя гиперхромными ядрами (Рис. 57). На некоторых участках сформированной хрящевой пластинки имелись включения плотной волокнистой соединительной ткани, формирующей надхрящницу (Рис. 58).

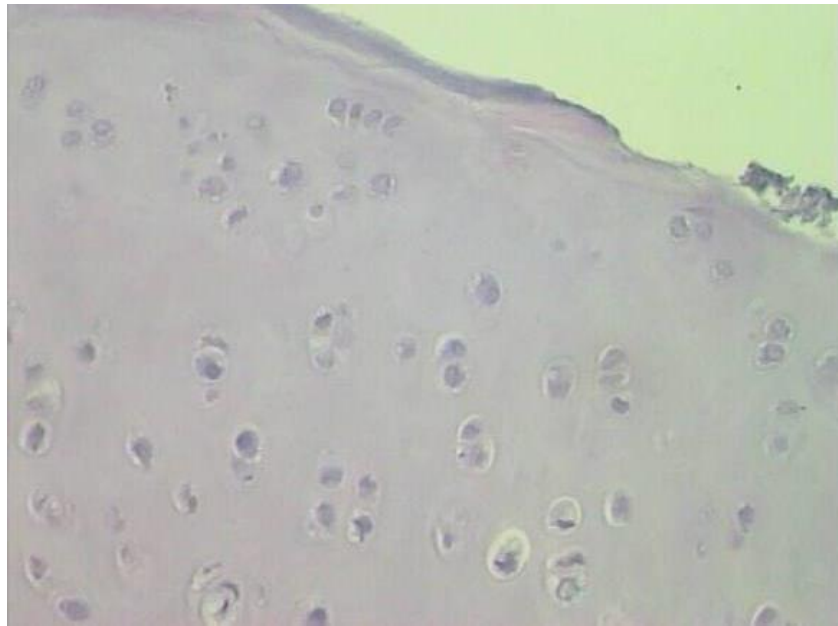


Рис. 57. Вновь сформированный гиалиновый хрящ в зоне бывшего дефекта. (Окраска гематоксилин – эозин. Увеличение 400).

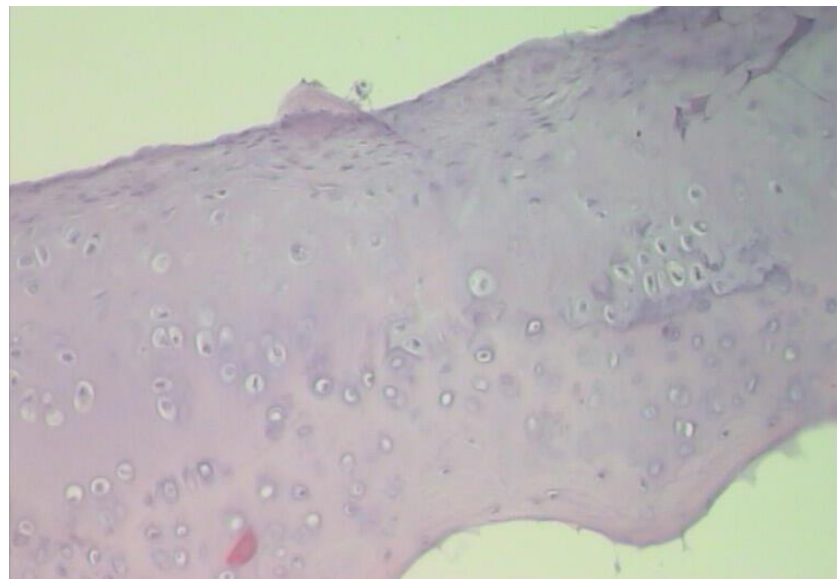


Рис. 58. Участок новообразованной хрящевой ткани с тонкой полоской надхрящницы. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

Отмечаются участки формирования субхондральной костной пластинки (Рис. 59).

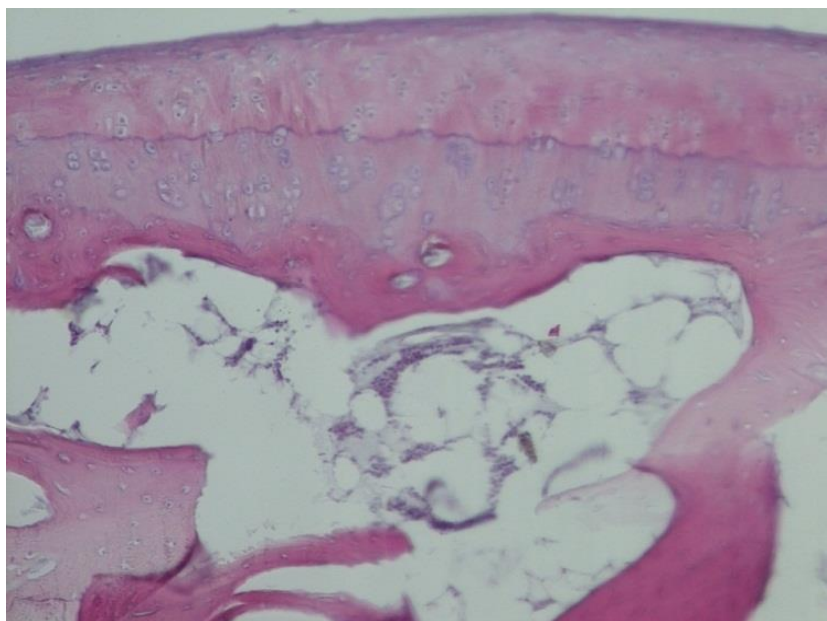


Рис. 59. Участок вновь образованного гиалинового хряща с формированием субхондральной костной пластинки. (Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение 200).

Анализ результатов исследования:

К 6 месяцам края дефекта представлены участками хрящевой ткани с неровным контуром, хрящевые клетки преимущественно с гиперхромными ядрами. В центральной зоне дефекта отмечалось формирование гиалинового хряща, местами максимально приближенного к интактному хрящу с обозначением зональности. Вновь образованный хрящ незначительно уступал по толщине и структурной организации предшествующей хрящевой ткани. Ниже хрящевой пластинки отмечалось формирование грубогубчатой костной ткани. Таким образом имело место неполное восстановление суставной поверхности коленного сустава с формированием ткани гиалинового хряща в стадии перехода к архитектонике интактного суставного хряща, с тенденцией к формированию субхондральной костной пластинки, костных структур субламинарной зоны. По-прежнему сохранялась неровность верхнего края хрящевой пластинки, мелкие островки

надхрящницы, повышенная активность клеточных элементов хрящевой ткани, костные балки субламинарной зоны имели грубогубчатое строение.

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, расположенными преимущественно по краям зоны дефекта. 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. 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.

На сроке наблюдения 6 месяцев полного восстановления хрящевого компонента и субхондральной костной пластинки не произошло как в контрольной группе, так и в группе животных, которым в качестве каркас-носителя в составе БМКП применялся «Chondro Gide». В группе животных с БМКП на основе матрицы «Остеопласт» в зоне дефекта отмечалось формирование гиалинового хряща, местами максимально приближенного к

интактному хрящу с обозначением зональности. Вновь образованный хрящ незначительно уступал по толщине и структурной организации предсуществующей хрящевой ткани. Субхондральная костная пластинка имела тенденцию к полному восстановлению.

Заключение

Медицинская и социальная актуальность проблемы лечения ограниченных повреждений суставного хряща обусловлена неудовлетворенностью пациентов результатами лечения, отсутствием единого подхода к тактике хирургической коррекции, а также необходимостью повторных вмешательств с течением времени. Все это обосновывает необходимость проведения дальнейших исследований.

Цель исследования – обоснование необходимости и разработка в эксперименте биомедицинского клеточного продукта для восстановления суставного хряща при локальных дефектах.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

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.

В клинической части проведено одноцентровое проспективное рандомизированное исследование результатов лечения 52 пациентов, которым по поводу локальных повреждений суставного хряща коленного сустава на базе ортопедического отделения взрослых «ННИИТО» («ПФМИЦ») в период с 2011 по 2015 годы выполнялись артроскопические остеоперфоративные методики стимуляции хондрогенеза.

Критериями включения пациентов в исследование служили:

- 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 см²;
- неэффективность консервативного лечения.

Согласно критериям включения в исследование вошли 52 пациента: 37 мужчин (71%) и 15 женщин (29%), средний возраст составил $28,7 \pm 8,4$ лет. Все пациенты в анамнезе имели травму коленного сустава, при этом 62% обследуемых получили травму во время занятий спортом, 32% - в быту, 6% - в результате ДТП. Причем правый коленный сустав повреждался в 64% случаев, левый - в 36%. Первично за медицинской помощью в поликлинику по месту жительства обращались 83% больных. В 58% случаев для постановки диагноза на амбулаторном этапе выполнялась Rg-графия коленного сустава в 2-х стандартных проекциях, в 30% - УЗИ коленного сустава, в 12 % - МРТ (причем 80% исследований проведено на томографе

0,3 Тл, 20% - на томографе 1,5 Тл). После проведенного обследования 35% пациентов поставлен диагноз: повреждение менисков коленного сустава (S83.2, M23.2), 31% - гонартроз (M17.0, M17.3), 27% - повреждение капсульно-связочного аппарата коленного сустава (S83), 7% - другие диагнозы. В течение $32,3 \pm 15,4$ дней в поликлинике по месту жительства проводился курс консервативного лечения: 100% пациентов получали НПВС в течение 1-2 недель, в 88% назначалась иммобилизация коленного сустава на срок от 2-х до 6-ти недель, в 62% - ФТЛ, в 75% - хондропротекторы, 18% больных выполнялось внутрисуставное введение препаратов глюкокортикостероидного ряда.

При неэффективности назначенного лечения пациенты обращались в консультативное отделение «ННИИТО» («ПФМИЦ»). На момент осмотра основными были жалобы на боль в области коленного сустава, ограничение объема движений. После осмотра проводилось дообследование: Rg-графия и МРТ коленного сустава (у тех пациентов, у которых ранее такое обследование не выполнялось). В 67% случаев на снимках МРТ визуализировались локальные дефекты суставного хряща коленного сустава разной локализации: 37% - блок бедренной кости, 32% - внутренний мыщелок бедренной кости, 17% - надколенник, 14% наружный мыщелок бедренной кости. Пациентам, не проходившим курс консервативного лечения в поликлинике по месту жительства, для уменьшения болевого синдрома, увеличения амплитуды движений коленного сустава назначали короткие курсы НПВС, ФТЛ, ЛФК, ограничение нагрузок, ношение ортопедических ортезов. Такой курс был эффективен для 35% пациентов. Они отмечали регресс клинических проявлений к 2-2,5 месяцам лечения. Показанием к артроскопическому вмешательству во всех случаях являлось сохранение болевого синдрома на фоне курса консервативного лечения в срок от 3 до 6 месяцев.

Непосредственно перед операцией всем пациентам проводились обследование, включающее в себя: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, коагулограмма, электрокардиография, УЗИ вен и артерий нижних конечностей. Затем проводили рандомизацию по планируемому способу хондропластики и переходили к хирургическому лечению.

Для проведения оперативного вмешательства во всех случаях использовали артроскопическую стойку «Smith&Nephew» с набором ручного инструментария «Acufex», шейвер с костными бурами и синовиальными фрез, холодно-плазменный аблятор фирмы «ArthroCare». Последовательность и техника интраоперационного осмотра коленного сустава с использованием стандартной последовательности.

Расхождение данных артроскопической картины и МРТ по локализации и распространенности повреждений суставного хряща наблюдали у 14 пациентов (в 27% случаев).

Визуальная и инструментальная оценки ограниченных дефектов суставного хряща при артроскопии позволяли определить стадию повреждения по классификации Outerbridge.

Во всех случаях при выявлении ограниченных дефектов суставного хряща 3,4 ст по Outerbridge площадью не более 4 см² с помощью стандартного набора инструментов выполняли один из остеоперфоративных способов хондропластики (мезенхимальной стимуляции хондрогенеза): абразивную хондропластику, туннелизацию или микрофрактуринг. Результатом применения данных хирургических техник являлось заполнение дна дефекта сгустком крови с элементами костного мозга.

Таким образом, из 52 пациентов были сформированы 3 группы:

1 группа – 15 пациентов, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялась абразивная хондропластика;

2 группа – 16 – пациентов, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялась туннелизация;

3 группа – 21 пациент, которым по поводу ограниченных дефектов суставного хряща выполнялся микрофрактуринг.

В связи с тем, что показания к выполнению остеоперфоративных способов хондрогенеза часто разнятся, а площадь повреждения варьирует при этом в диапазоне $0 < S \leq 4 \text{ см}^2$, для оценки эффективности применения этих способов хондропластики в зависимости от площади дефекта суставного хряща все группы были разделены на 2 подгруппы:

1 - площадь дефекта хряща $S \leq 2 \text{ см}^2$;

2- площадь дефекта $2 < S \leq 4 \text{ см}^2$.

Для анализа функции коленного сустава в динамике: до операции, через 3,6,12,24 месяца после операции, была использована 100-бальная шкала Joseph & Kaufman.

Экспериментальное исследование разделено на несколько этапов, первым из которых был анализ цитотоксичности и особенностей адгезивных свойств коллагеновых матриц-носителей «Chondro Gide» и «Остеопласт» *in vitro*.

В работе использовали стромальные клетки костного мозга кроликов, выделенного из подвздошных и бедренных костей животных. Для выделения клеток из костного мозга применяли метод селективной адгезии к пластику. Культивирование проводили по стандартной технологии. В экспериментах использовали культуру 3-4 пассажей.

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки использовали набор Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, USA). В качестве специфических красителей для оценки дифференцировки применяли: 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. Результаты выражали, как долю клеток, несущих соответствующий маркер (в %).

Сравнительное исследование цитотоксичности проводили согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 методом прямого контакта, так как исследуемые материалы использовались в непосредственном контакте с кровью и тканями. СККМ кролика засеивали с плотностью 5 тыс./ см² в чашки Петри площадью 7 см². Через 24 часа после посева отмечали формирования монослоя на поверхности пластика, после чего осторожно, стараясь не повредить клетки, на них переносили образцы коллагеновых матриц «Остеопласт» и «Chondro Gide», предварительно промытые в среде 199 с антибиотиками (пенициллин/стрептомицин) в течение 24 часов. Размер каждого образца составлял 0,7 см² (10% от площади чашки). Контролем служили культура в чашках без матриц. Каждые 24 часа после начала взаимодействия с образцами фиксировали состояние культуры в видеоархив. По достижении конфлюэнтного монослоя (96 часов) в контрольных сериях оценивали морфологию клеток, состояние монослоя, после чего культуру с чашек с контрольными и опытными сериями снимали с помощью раствора трипсина с ЭДТА, подсчитывали плотность и жизнеспособность клеток. Каждый

эксперимент повторяли трижды.

Для оценки адгезии клеток на поверхности и в толще мембраны «Chondro Gide» и матрицы «Остеопласт» взвесь СККМ 3 пассажа в концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл заседали на поверхность каркасов и вводили непосредственно в их толщу с помощью шприца. После введения клеточной суспензии в чашки добавляли ростовой среды до общего объема 2 мл для того, чтобы образцы были погружены в среду. Чашки с образцами помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях, культивировали и контролировали рост культуры в течение 96 часов, проводя видеоархивирование каждые 24 часа. Каждые 48 часов проводили смену ростовой среды.

Через 48 часов культивирования часть образцов забирали для исследования методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cytation 5 (BioTek, USA), позволяющем визуализировать клетки не только на поверхности, но внутри мембран.

Прижизненное окрашивание ядер клеток, адгезировавшихся на материале, проводили с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) обладающего высокой специфичностью к двухцепочечной молекуле ДНК (длина волны возбуждения 377 нм, длина волны эмиссии 447 нм). Окрашивание проводили в соответствии с протоколом производителя.

Для маркировки живых клеток и характеристики их морфологии использовали кальцеин (Calcein AM, BD Pharmingen™), легко проникающий в жизнеспособные клетки. Внутри клеток эстеразы отщепляют аминокислоты от не флуоресцентного кальцеина, который после этого начинает флуоресцировать (длина волны возбуждения 469 нм, длина волны эмиссии 525 нм). Окрашивание Calcein проводили в соответствии с протоколом производителя.

Часть образцов обеих мембран с клетками культивировали в стандартных условиях в течение 96 – 120 часов, каждые 24 часа контролируя миграцию клеток из образцов на пластик.

Для исследования совместного действия СККМ и «Chondro Gide», СККМ и «Остеопласт» на процессы восстановления повреждения хряща СККМ кролика 3 пассажа в концентрации 2 млн/мл вводили шприцом непосредственно в толщу образцов, каждый из которых был 0,33 см в диаметре, и засеивали на его поверхность. Образцы предварительно промывались в ростовой среде в течение 24 часов. После введения клеточной суспензии добавляли ростовую среду до общего объема 2 мл. Чашки с образцами помещали в CO₂ –инкубатор при стандартных условиях. Через 24 часа образцы отмывали физиологическим раствором и предавали для введения животным.

Исследование хондропластических свойств подготовленных биомедицинских клеточных продуктов проводили *in vivo*. Эксперимент проводился на кроликах породы «Серый великан» 6-11 месячного возраста весом от 2900 до 5000 г. Выведение животных из эксперимента осуществляли воздушной эмболией под наркозом.

Принятая для исследований модель ограниченного дефекта суставного хряща готовилась с помощью устройства для забора костно-хрящевых фрагментов суставной поверхности (Патент РФ №164921), которое позволяло сформировать однотипные цилиндрические дефекты 3.3 мм в диаметре и 1,5 мм глубиной у всех животных в эксперименте.

У лабораторных животных контрольной группы оперативное вмешательство ограничивалось формированием костно-хрящевого дефекта суставной поверхности, у кроликов двух опытных групп производилось его замещение с помощью заранее подготовленных БМКП.

В группе Опыт 1 БМКП состоял из двухслойной непроницаемой коллагеновой матрицы «Chondro Gide» с предварительно выращенными на ней аллогенными стромальными клетками костного мозга. В группе Опыт 2 в качестве матрицы-носителя в составе БМКП использовался трехмерный проницаемый коллагеновый сетчатый каркас «Остеопласт».

Животные из эксперимента выводились поэтапно: через 3 и 6 месяцев. Образцы тканей дефекта подвергались макроскопической оценке, гистоморфологическому и морфометрическому исследованиям.

Гистоморфологическое исследование выполнялось по стандартной методике.

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, мкм (hd) к высоте суставного хряща в зонах, граничащих с дефектом, мкм (hk).

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.

Результаты клинических исследований

Проведено одноцентровое проспективное рандомизированное исследование результатов лечения 52 пациентов с локальными дефектами суставного хряща коленного сустава, разделенные на три неравных группы которым выполнялись артроскопические остеоперфоративные методики

стимуляции хондрогенеза (абразивная хондропластика, туннелизация и микрофрактуринг).

Проведенная динамическая оценка результатов лечения по шкале Joseph & Kaufman демонстрировала постепенное увеличение показателей с максимальными значениями через 24 месяца после оперативного вмешательства, при этом статистически значимых отличий между группами не наблюдалось.

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.

Через 24 месяца после операции хорошие и отличные результаты отмечены у всех пациентов с исходной площадью повреждения ≤ 2 см², при этом не наблюдали статистически значимой разницы между применяемыми методиками. У 7 пациентов с площадью дефекта $2 < S \leq 4$ см² 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.

Проведенный корреляционный анализ на сроках наблюдений 3 и 24 месяца демонстрирует обратную связь между исходной площадью дефекта суставного хряща и результатами лечения, соответствующими показателям шкалы Joseph & Kaufman.

Таким образом, на основании данного этапа исследования сделан вывод, что применение остеоперфоративных способов хондропластики является эффективным для восстановления суставного хряща при локальных дефектах площадью не более 2 см². При этом статистически значимой разницы между абразивной хондропластикой, туннелизацией и микрофрактурированием не выявлено. Возможно применение любого из вышеуказанных методов в зависимости от оснащения операционной и личных предпочтений хирурга.

Результаты экспериментальных исследований

На протяжении всего периода наблюдения выделенные клетки кролика сохраняли типичную фибробластоподобную форму с четкими контурами и выраженными отростками, крупными овальными ядрами с двумя-четырьмя ядрышками.

При определении фенотипа клеток выявлено, что большинство клеток (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 соответствовало фенотипу СККМ. Клетки, выделенные из костного мозга кролика, хорошо распластывались и адгезировались на пластике, были способны к дифференцировке в трех направлениях (в адипоциты, остеоциты и хондроциты), несли маркеры, характерные для мезенхимальных стромальных клеток и, следовательно, по своему происхождению и характеристикам являлись стромальными клетками костного мозга.

При исследовании цитотоксичности 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. Статистически значимой разницы по плотности и жизнеспособности клеток в контрольной и опытных группах не выявлено.

Таким образом, обе исследуемые матрицы и «Остеопласт», и «Chondro Gide» 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 миграции СККМ кролика с исследуемых образцов матриц отмечено, что уже через 24-48 часов наблюдалось 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.

Таким образом, СККМ кролика переносились 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.

При оценке адгезии клеток с помощью флуоресцентной микроскопии на поверхности и в порах матрицы «Остеопласт» через 24 часа фиксировалось большое количество окрашенных Hoechst 3334 флуоресцирующих ядер клеток. Использование кальцеина позволяло увидеть клетки типичной для СККМ веретеновидной формы на поверхности мембраны и подтверждало их жизнеспособность.

Полученные результаты демонстрировали, 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 фиксируется большое количество флуоресцирующих ядер клеток, равномерно распределенных на поверхности мембраны. Применение

прижизненной окраски кальцеином демонстрировало, что на поверхности мембраны «Chondro Gide» СККМ кролика распластываются, сохраняя жизнеспособность и типичную фибробластоподобную форму.

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

Обе исследованные матрицы не токсичны для СККМ кролика. Через 48 часов культивирования на матрицах клетки распределяются на поверхности их поверхности, сохраняют жизнеспособность и типичную морфологию.

СККМ кролика при культивировании *in vitro* способны мигрировать на поверхность пластика с мембраны «Остеопласт», сохраняя типичную морфологию и пролиферативную активность. Выраженной миграции клеток с мембраны «Chondro Gide» не выявлено.

При морфометрическом исследовании области восстановленного дефекта изъятых образцов на сроке наблюдения 3 месяца отмечалось отсутствие восстановления дефекта в контрольной группе, исключающее возможность проведения морфометрии хряща в центральной зоне дефекта и последующую статистическую обработку данных. В опытных группах наблюдалось частичное восстановление области дефекта, КВ в группе Опыт 1 составил $0,57 \pm 0,05$, в группе Опыт 2 этот показатель был равным $0,79 \pm 0,04$ ($P_{\text{Опыт1,2}} = 0,0001$).

Таким образом, через 3 месяца наблюдений в каждом исследуемом срезе каждой группы КВ был менее 0,85, исход восстановления ограниченных повреждений суставного хряща расценивался как неблагоприятный.

Через 6 месяцев наблюдений в контрольной группе отмечено частичное восстановление области дефекта, КВ составил $0,62 \pm 0,06$. В группе Опыт 1 КВ был равным $0,79 \pm 0,07$, в группе Опыт 2 КВ находился на уровне $0,88 \pm 0,02$ ($P < 0,03$ с учетом множественных сравнений).

Исходя из полученных данных следует, что после формирования дефекта суставного хряща, без замещения его БМКП, возможно его частичное восстановление.

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.

При гистоморфологическом исследовании области дефекта суставного хряща на сроке наблюдения 3 месяца в группах Опыт 1 и Опыт 2 отмечалась ранняя репаративная реакция с тенденцией к активации хондрогенеза с формированием хрящеподобной ткани с наличием крупных хондроцитов, в то время как в контрольной группе животных восстановления хрящевой пластинки к данному сроку наблюдения не отмечалось.

При исследовании образцов 6 месяцев наблюдения в контрольной группе края дефекта частично выполнены склерозированной костной тканью. В центральной зоне дефекта наблюдается неполное восстановление костной и хрящевой тканей, хрящевая пластинка визуально тоньше интактной хрящевой пластинки зон, окружающего суставного хряща. В группе Опыт 1 к 6 месяцам края дефекта выполнены участками сформированного гиалинового хряща и подлежащей костной пластинкой. Сформированная зона дефекта представлена участками неравномерной плотности костной ткани, а также участками вновь сформированного гиалинового хряща с фокусами ткани волокнистого хряща. Костные

структуры в отдельных участках выполняют зону существующего хряща. До уровня интактного гиалинового хряща восстановления не произошло. Субхондральная костная пластинка не сформирована. В группе Опыт 2 края дефекта представлены участками хрящевой ткани с неровным контуром. В центральной зоне дефекта отмечается формирование гиалинового хряща, местами максимально приближенного к интактному хрящу с обозначением зональности. Вновь образованный хрящ незначительно уступал по толщине и структурной организации предсуществующей хрящевой ткани. Ниже хрящевой пластинки отмечалось формирование грубогубчатой костной ткани. В результате имеет место неполное восстановление суставной поверхности коленного сустава с формированием ткани гиалинового хряща в стадии перехода к архитектонике интактного суставного хряща, с тенденцией к формированию субхондральной костной пластинки, костных структур субламинарной зоны. По-прежнему сохранялась неровность верхнего края хрящевой пластинки, мелкие островки надхрящницы, повышенная активность клеточных элементов хрящевой ткани, костные балки субламинарной зоны имеют грубогубчатое строение.

Таким образом, на основании полученных данных считаем обоснованным проведение следующих этапов исследования предложенного биомедицинского клеточного продукта на основе матрицы «Остеопласт» с выращенными в ее структуре стромальными клетками костного мозга.

Выводы:

1. Остеоперфоративные способы хондропластики при лечении пациентов с ограниченными дефектами суставного хряща коленного сустава наиболее эффективны при площади дефекта $\leq 2 \text{ см}^2$ ($p < 0,05$).
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 ($КВ=0,62\pm 0,06$). При использовании БМКП на основе матрицы «Chondro Gide» во вновь образованном гиалиновом хряще не отмечалось адекватного замещения структуры с обозначением зональной организации ($КВ=0,79\pm 0,07$). 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 ($КВ=0,88\pm 0,02$) ($p < 0,03$ с учетом множественных сравнений).
4. Применение биомедицинского клеточного продукта на основе матрицы «Остеопласт» позволяет достичь $КВ=0,88\pm 0,02$ (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

1. При выборе способа хондропластики ограниченных дефектов суставного хряща необходимо оценивать площадь и локализацию повреждения, степень хондромалиции смежного отдела сустава, а также возраст пациента.
2. Обязательным условием для предоперационного планирования является проведение МРТ, которая позволяет визуализировать дефект суставного хряща, оценить его локализацию и глубину.
3. Для восстановления суставного хряща при локальных дефектах площадью более 2 см² следует использовать способы хондропластики, основанные на трансплантации костно-хрящевых блоков, применении покровных матриц или биомедицинских клеточных продуктов. Остеоперфоративные методы хондропластики малоэффективны.
4. 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 литературы

1. Артроскопическая диагностика в лечении заболеваний и повреждений коленного сустава: учебное пособие / А.В. Королев [и др.]. – Москва : РУДН, 2008. – 83 с.
2. Блоков, М. Совершенствование техники артроскопической мембранной хондропластики мыщелков бедренной кости / М. Блоков, А. Гаркави, А. Лычагин // Врач. – 2014. – № 9. – С. 36-38.
3. Зоря, В. И. Деформирующий артроз коленного сустава : руководство для врачей / В. И. Зоря, Г. Д. Лазишвили, Д. Е. Шпаковский. – М.: Литтерра, 2010. – С. 320.
4. Изучение болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде после артроскопической туннелизации, микрофрактурирования и мозаичной аутохондропластики у пациентов с наличием локальных дефектов хряща коленного сустава / А.В. Королев [и др.] // Научный журнал трудов I Евразийского конгресса травматологов-ортопедов. – 2009. – С. 303.
5. Иммуно-гистохимическая характеристика культуры клеток жировой ткани, используемой для артропластики дефектов хряща коленного сустава / Т.А. Куляба [и др.] // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием. – СПб. –2010. – С.264-265.
6. Имплантация мембраны CHONDRO-GIDE при гонартрозах – артроскопия или артротомия? / М. Блоков [и др.] // Врач. – 2014. – № 10. – С. 46-49.
7. Использование аутологичных хондроцитов для восстановления поврежденного суставного хряща / С.П. Миронов [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2008. – № 4. – С. 84-91.

8. Классификация и методы лечения хрящевых дефектов /С.П. Миронов [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2008. – № 3. – С. 81-85.
9. Корнилов, Н.В. Травматология и ортопедия : пособие для врачей в 4 томах / Н.В. Корнилов, Э.Г. Грязнухин. СПб. : Гиппократ. – 2005. – Т. 3. – С. 273-284.
- 10.Корнилов, Н.Н. Современные взгляды на этиопатогенез, принципы диагностики и консервативную терапию дегенеративно-дистрофических заболеваний коленного сустава / Н.Н. Корнилов, К.А. Новоселов, Н.В. Корнилов // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 2. – С. 47-49.
- 11.Котельников, Г.П. Мозаичная хондропластика в лечении больных с дефектами суставной поверхности коленного сустава – возможности и перспективы / Г.П. Котельников, Ю.В. Ларцев, Д.С. Кудашев // Материалы X Юбилейного всероссийского съезда травматологов-ортопедов. – СПб. : Человек и его здоровье. – 2014. – С. 461.
- 12.Котельников, Г.П. Первый опыт клинического применения культивированных in vitro аутохондроцитов для пластики дефектов гиалинового хряща коленного сустава / Г.П. Котельников, Ю.В. Ларцев, Д.С. Кудашев // Сб. тез. IX Съезда травматологов ортопедов / Под ред. акад. РАН и РАМН С.П. Миронова, д.м.н., проф. И.А. Норкина. – Саратов : СарНИИТО. – 2010. – Т. 1. – С. 434-435.
- 13.Котельников, Г.П. Доказательная медицина. Научно-обоснованная медицинская практика / Г.П. Котельников, А.С. Шпигель. – Самара : [б.и.], 2000. – 208 с.
- 14.Котельников, Г.П. Результаты идентификации клеток, полученных из реберной гиалиновой хрящевой ткани кроликов, с целью создания комбинированного трансплантата для хондропластики / Г.П. Котельников [и др.] // Материалы X Юбилейного всероссийского

- съезда травматологов-ортопедов. – СПб. : Человек и его здоровье. – 2014. –С. 460.
- 15.Кудашев, Д.С. Комплексный подход в лечении больных с деструктивно-дистрофическими и травматическими поражениями хряща в коленном суставе / Д.С. Кудашев // Аспирантский вестник Поволжья. – 2008. – № 3/4. – С. 108-112.
- 16.Кузнецов, И.А. Принципы артроскопического лечения болезни Кенига коленного сустава : пособие для врачей / И.А. Кузнецов, В.В. Монахов, А.В. Селин. – СПб.: ГУ РосНИИТО им. Р.Р. Вредена, –2003. – 20 с.
- 17.Куляба, Т.А. Отдаленные результаты мозаичной костно-хрящевой аутопластики при лечении заболеваний и повреждений хряща коленного сустава / Т.А. Куляба, Н.Н. Корнилов, А.В. Селин // Травматология и ортопедия России. – 2007. –№3. – С. 24.
- 18.Лаврищева, Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко. М. : Медицина, 1996. – 208 с.
- 19.Лазебник, Л. Б. Иммунологическая и онкологическая безопасность аутологичных и аллогенных стромальных клеток костного мозга/ Л.Б.Лазебник, В.Э. Сагынбаева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – Т. 107, №7. – С.67-71.
- 20.Ларцев, Ю.В. Комплексный подход к лечению больных деформирующим гонартрозом / Ю.В. Ларцев // Травматология и ортопедия XXI века: сб. тез. докладов VIII съезда травматологов-ортопедов России. – Самара.-2006. – С. 557–558.
- 21.Ларцев, Ю.В. Новый способ лечения больных с дефектами гиалинового хряща коленного сустава / Ю.В. Ларцев, Д.С. Кудашев // Сб. тез. IX съезда травматологов-ортопедов. – Саратов. – 2010. – Т. 1. – С. 451-452.
- 22.Лечение локального глубокого дефекта хряща коленного сустава, сочетающегося с медиальным гонартрозом 1 стадии и варусной

- деформацией нижней конечности / Т.А. Куляба [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 1. – С.92-95.
- 23.Макушин, В.Д. Субхондральная туннелизация: вопросы технологии и эффективности лечения при гонартрозе (обзор литературы и собственные данные) / В.Д. Макушин, О.К. Чегуров // Гении ортопедии. – 2006. – № 4. – С. 99-104.
- 24.Макушин, В.Д. Новые технологические решения туннелирования суставных отделов при гонартрозе / В.Д. Макушин, О.К. Чегуров, М.Ю. Бирюкова // Здоровоохранение на путях его устойчивого развития : сборник научно-практических работ – Челябинск. – 2006. – С. 468-474.
- 25.Маланин, Д.А. Пластика полнослойных дефектов гиалинового хряща в коленном суставе: экспериментальные и клинические аспекты репаративного хондрогенеза : дис. ... д-ра мед. Наук: 14.00.15, 14.00.22 / Дмитрий Александрович Маланин. – Волгоград, 2002. – 276 с.
- 26.Методы артроскопического лечения хрящевых дефектов коленного сустава / А.В. Королёв [и др.] // Сборник материалов Научно-практической конференции, посвящённой 40-летию ГКБ №31. – 2010. - С. 117-118.
- 27.Модяев, В.П. Некоторые особенности репродукции хондроцитов в суставном хряще / В.П. Модяев // Физиология и патология соединительной ткани: сборник тезисов / ред. В.В. Виноградов. – Новосибирск, 1980. –Т. 1. – С. 149-150.
- 28.Мурин, Д.В. Современные подходы хирургического лечения пациентов с изолированным повреждением суставного хряща медиального мыщелка бедренной кости и варусной деформацией коленного сустава / Д.В. Мурин, В.П. Волошин // Материалы X Юбилейного всероссийского съезда травматологов-ортопедов. – СПб. : Человек и его здоровье. – 2014. – С. 249.

29. Негреева, М.Б. Лечебно-диагностический алгоритм при остеоартрозах / М.Б. Негреева // Материалы X Юбилейного всероссийского съезда травматологов-ортопедов. – СПб. : Человек и его здоровье. –2014. – С. 250.
30. Новиков. В.В. Оперативное лечение повреждений хряща коленного сустава / В.В. Новиков, Я.В. Линько // Скорая медицинская помощь. – 2003. – Спец. выпуск. С. 65.
31. Новочадов, В.В. Признаки мозаичного строения гиалинового хряща: количественное морфологическое исследование локтевого сустава кролика / В.В. Новочадов, А.Ю. Алексеенко, П.А. Крылов // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2014. – № 3. – С. 33-39.
32. Общая теория статистики: учебник/В.Н. Едророва, М.В. Малафеева,- 2-е изд., перераб. И доп. (ГРИФ).- М.: Издательство «Магистр», 2010, - 606 с.
33. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия): монография / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий. – М.: Известия, 2011 – 380 с.
34. Особенности направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты и подготовка биоимплантата на их основе / В.В. Багаева [и др.] // Материалы X Юбилейного всерос. съезда травматологов-ортопедов. – СПб.: Человек и его здоровье. – 2014. – С. 446.
35. Особенности регенеративных процессов области пластики костно-хрящевых дефектов комбинированными трансплантатами на основе аутологичных и аллогенных клеток из реберной хрящевой ткани в эксперименте у кроликов / Г.П. Котельников [и др.] // Материалы X Юбилейного всероссийского съезда травматологов-ортопедов. – СПб. : Человек и его здоровье. – 2014. – С. 460.

36. Оценка современных методов хондропластики дефектов гиалинового хряща коленного сустава / А.А. Стадников [и др.] // Научно-практическая Ревмоортопедия. – 2008. – № 6. – С. 82-85.
37. Павлова, В.Н. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слущкий, Г.Г. Павлов М.-1988. - 455 с.
38. Павлова, В.Н. Электронная микроскопия суставного хряща человека / М.Н. Павлова // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1979. – №7. – С. 65-71.
39. Применение мезенхимальных стромальных клеток, нанесенных на композиционные материалы для оптимизации регенерации костной ткани / Т.Ю. Татаренко-Козмина [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 1. – С. 23-25.
40. Регенерация дефектов суставного хряща при использовании культивированных мезенхимальных клеток костного мозга / С.Н. Белогородцев [и др.] // Травматология и ортопедия XXI века : сб. тез. и докл. – 2006. – Т. 2. – С. 1032.
41. Результаты трансплантации культуры аутогенных стромальных клеток костного мозга в область краевого дефекта длинных трубчатых костей / Р.В. Деев [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2007. – Т. 2, №44. – С. 57-63.
42. Современные возможности и перспективы хирургического лечения повреждений и заболеваний хряща / О.Л. Эйсмонт [и др.] // Мед. Новости. – 2008. – № 7. – С. 12-19.
43. Стромальные клетки жировой ткани – пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом / Д.О. Тракуев [и др.] // Цитология. – 2005. – Т. 48, №2. – С. 83-93.
44. Ступина, Т.А. Клеточно-тканевая терапия при лечении остеоартроза коленного сустава: сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной

- трансплантологии» / ред. С.П. Миронов. – СПб.: Человек и здоровье. – 2010. – С. 122-123.
45. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / В.Н. Павлова, Г.Г. [и др.]. – М.: МИА, 2011. – 552 с.
46. Хирургические методы лечения пациентов с локальными дефектами суставной поверхности мыщелков бедренной кости (обзор литературы) / А.И. Брянская [и др.] // Травматология и ортопедия России. – Т.4, №58. – 2010. – С.84-92.
47. Хирургические способы лечения локальных полнослойных дефектов хряща мыщелков бедренной кости / Р.М. Тихилов [и др.] // Материалы съезда травматологов и ортопедов РФ. – Саратов. – 2010. – Т. II. – С.537-538.
48. Хлопин, Н.Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии: практическое руководство / Н.Г. Хлопин. – Л. : изд-во АН СССР. – 1946. – 491 с.
49. Шапиро, К.И. Частота повреждений крупных суставов у взрослых / К.И. Шапиро // Диагностика и лечение повреждений крупных суставов. – СПб. –1991. – С. 3-5.
50. Экспериментальные аспекты изучения репаративной регенерации суставного хряща в условиях туннелирования субхондральной зоны с введением аутологичного костного мозга / В.И. Шевцов [и др.] // Гении ортопедии. – 2010. – № 2. – С. 5-10.
51. A Comparative study of drilling versus microfracture for cartilage repair in a rabbit model / H. Chen [et al.] // Europ. Cells and Materials. – 2008. – Vol. 16. – P. 7.
52. A fresh osteochondral allograft alternative / A.E. Gross [et al.] // J. Arthroplasty. – 2002. – Vol. 17. – P. 50-53.

53. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse / J.E. Dennis [et al.] // J. Bone Miner Res. – 1999. – Vol. 14. – P. 700-709.
54. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years / G. Knutsen [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2007. – Vol. 89, № 10. – P. 2105-2112.
55. Adhesion of perichondrial cells to a polylactic acid scaffold / A. Giurea [et al.] // J. Orthop. Res. – 2003. – Vol. 21. – P. 584-589.
56. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential / A. Peister [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 103, № 5. – P. 1662-1668.
57. AG «ACT und Tissue Engineering» unter der Schirmherrschaft der DGU und DGOOC / P. Behrens [et al.] // DGU – Mitteilungen und Nachrichten, – 2002. – Vol. 45. – P. 43-51.
58. Al-Omran, A.S. Arthroscopic joint lavage in osteoarthritis of the knee. Is it effective? / A.S. Al-Omran, M. Sadat-Ali // Saudi Med. J. – 2009. – Vol. 30, №6. – P. 809-812.
59. Animal models for cartilage reconstruction / G.G. Reinholz [et al.] // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – P. 1511-1521.
60. Arthroscopic autogenous osteochondral transplantation for treating knee cartilage defects: a 2- to 5-year follow-up study / J.C. Chow [et al.] // Arthroscopy. – 2004. – Vol. 20. – P. 681-690.
61. Arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee / R.K. Aaron [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2006. – Vol. 88, №5. – P. 936-943.
62. Arthroscopic knee chondroplasty using a bipolar radiofrequency-based device compared to mechanical shaver: results of a prospective, randomized,

- controlled study / G. Spahn [et al.] // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2008. – Vol. 16. – P. 565-573.
63. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies / K. Hjelle [et al.] // *Arthroscopy.* – 2002. – Vol. 18. – P. 730-734.
64. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results / M. Marcacci [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2005. – Vol. 435. – P. 96-105.
65. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies / A. Aroen [et al.] // *Am. J. Sports Med.* – 2004. – Vol. 32. – P. 211-215.
66. Articular cartilage: structure and regeneration / J. Becerra [et al.] // *Tissue Eng. Part B. Rev.* – 2010. – Vol. 16, № 6. – P. 617-627.
67. Association between age and knee structural change: a cross sectional MRI based study / C. Ding [et al.] // *Ann. Rheum Dis.* – 2005. – Vol. 64, № 4. – P. 549-555.
68. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study / W. Bartlett [et al.] // *Bone Joint Surg. Br.* – 2005. – Vol. 87, № 5. – P. 640-645.
69. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review / J.D. Harris, R.A. Siston [et al.] // *J. Bone Joint. Surg. Am.* – 2010. – Vol. 92. – P. 2220-2233.
70. Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes / L. Batty [et al.] // *ANZ J. Surg.* – 2011. – Vol. 81, № 1-2. – P. 18-25.
71. Autologous osteochondral transplantation for the treatment of knee lesions: results and limitations at two years' follow-up / F. Giuseppe [et al.] // *International Orthopedics.* – 2015. – Vol. 38. – № 9. – P. 1905-1912.

72. Autologous chondrocyte implantation: cells phenotype and proliferation analysis / F. Greco [et al.] // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2009. – Vol.9. – P. 254-258.
73. Baksh, D. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation and application in cell and gene therapy / D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan // *S. Cell Mol. Med.* – 2004. – Vol. 8, № 3. – P. 301-316.
74. Bauge, C. Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments / C. Bauge, K. Boumediene // *Stem Cell Int.* – 2015. – P. 1-14.
75. Benthien, J.P. We do not have evidence based methods for the treatment of cartilage defects in the knee / J.P. Benthien, M. Schwaninger, P. Behrens // *Knee Surg. Sports Traumatol Arthrosc.* – 2011. – Vol. 19, № 4. – P. 543-552.
76. Bianco, P. Marrow stromal stem cells / P. Bianco, B. Gehron // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 105. – P. 1663-1668.
77. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering / S. Stratton [et al.] // *Bioactive Material.* – 2016. – Vol. 1. – №. 2. – P. 93-108.
78. Bobic, V. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study / V. Bobic // *Knee Surg. Sports Traumatol Arthrosc.* – 1996. – Vol. 3. – P. 262-264.
79. Bugbee, W.D. Fresh osteochondral allograft transplantation for cartilage lesions in the knee / W. D. Bugbee, A. Ho, S. Gortz // *Program and abstracts of the American Academy of Orthopaedic Surgeons Annual Meeting.* – Chicago: Illinois, 2006. – 151 p.
80. Bugbee, W.D. Osteochondral allograft transplantation / W.D. Bugbee, F.R. Convery // *Clin. Sports Med.* – 1999. – №18. – P. 67-75.
81. Cain, E.L. Treatment algorithm for osteochondral injuries of the knee / E.L. Cain, W.G. Clancy // *Clin. Sports Med.* – 2007. – № 20. – P. 321-342.

82. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century / A.I. Caplan, S.P. Bruder // Trends Mol. Med. – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 259-264.
83. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies / W.W. Curl [et al.] // Arthroscopy. – 1997. – Vol. 13. – P. 456-460.
84. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold / Y. Uchio [et al.] // Biomaterials. – 2006. – Vol. 20. – P. 4273-4279.
85. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold / K. Uematsu [et al.] // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26, № 20. – P. 4273-4279.
86. Cartilage thickness matching of selected donor and recipient sites for osteochondral autografting of the medial femoral condyle / M. Thunat [et al.] // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. – 2007. – Vol. 15. – P. 381-386.
87. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. / C.H. Chang [et al.] // J. Biomed Mater Res. B. Appl. Biomater. – 2004 – Vol. 71. – P. 313-321.
88. Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes / F. Wolf [et al.] // Eur. Cell Mater. – 2008. – Vol. 16. – P. 92-99.
89. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the Matrix-induced autologous chondrocyte implantation / M. Brittberg [et al.] // Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. Biomaterials. – 1997. – Vol. 18. – P. 235-242.

90. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure / M. Brittberg // *Am. J. Sports Med.* – 2010. – Vol. 38. – P. 1259-1271.
91. Cellulose sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering / H. Pulkkinen [et al.] // *Biomed Mater Eng.* – 2006. – Vol. 16. – P. 29-35.
92. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering / F.A. Muller [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – P. 3955-3963.
93. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny / H. Castro-Malaspina [et al.] // *Blood.* – 1980. – Vol. 56. – P. 289-301.
94. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering / D.J. Griffon [et al.] // *Acta Biomater.* – 2006. – Vol. 2. – P. 313-320.
95. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells / C.M. Mierisch [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2003. – Vol. 85 – P. 1757-1767.
96. Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix / B.O. Diekman [et al.] // *Tissue Eng.* – 2010. – P. 523-533.
97. Chondrogenic differentiation mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components / F. Barry [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2001. – Vol. 268, № 2. – P. 189-200.
98. Chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes differs in biodegradable PGA/PLA scaffolds / J. Zwingmann [et al.] // *Tissue Eng.* – 2007. – Vol. 13. – P. 2335-2343.
99. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis / K. Mithoefer [et al.] // *Am. J. Sports Med.* – 2009. – Vol. 37, № 10. – P. 2053-2063.

100. Clinical results after three years use of matrix-associated ACT for the treatment of osteochondral defects of the knee / U. Maus [et al.] // *Z. Orthop. Unfall.* – 2008. – Vol. 146, № 1. – P. 31-37.
101. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source / Y. Sakaguchi [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2005. – Vol. 52. – P. 2521-2529.
102. Current treatments of isolated articular cartilage lesions of the knee achieve similar outcomes / H. C. Lim [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2012. – Vol. 470. – P. 2261-2267.
103. Dandy, D.J. Arthroscopic management of the knee / D.J. Dandy. – New York. : Churchill Livingstone. – 1987. – 223 p.
104. Defrere, J. Teflon / Polyurethane arthroplasty of the knee: the first 2 years preliminary clinical experience in a new concept of artificial resurfacing of full thickness cartilage lesions of the knee / J. Defrere, A. Franckart // *Acta. Chir. Belg.* – 1992. – Vol. 92. – P. 217-227.
105. Distal realignment and patellar autologous chondrocyte implantation: mid-term results in a selected population / A. Gigande [et al.] // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2009. – Vol. 17. – P. 2-10.
106. Effect of the physicochemical properties of pure or chitosan-coated poly (-lactic acid) scaffolds on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients / J. Magalhaes [et al.] // *Tissue Eng.* – 2015. – Vol. 21. – P. 716-728.
107. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model / C.R. Lee [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2003. – Vol. 21. – P. 272-281.
108. Engineering complex tissues / A. Atala [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 4, № 160 – P. 160-172.

109. Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques / K. Ashvin [et al.] // *BioMed. Res. Int.* – 2014.
110. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation—a systematic review / J.D. Harris [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2011. – Vol. 19. – P.779-791.
111. Fraitzl, C.R. Kniegelenk – Arthrose und Arthritis / C.R. Fraitzl, M. Flören, H. Reichel // *Orthop.Unfallchir.* – 2008. – Vol. 2. – P. 155-176.
112. Fresh osteochondral allografts for posttraumatic defects in the knee. A survivorship analysis / R.J. Beaver [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br.* – 1992. –Vol. 74, № 1. – P. 105-110.
113. Friendlander, G.E. Immune responses to osteochondral allografts / G.E. Friendlander // *Clin. Orthop.* – 1983. – Vol. 174. – P. 58-68.
114. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study / C. Albrecht [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2011. – Vol.19, №10. – P. 1219-27.
115. Hangody, L. Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. / L. Hangody et al. // *Clin. Orthop.* - 2001. - N 391, suppl. - P. 328-338.
116. Hendrickson, D.A. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects / D.A. Hendrickson, A.J. Nixon, D.A. Grande // *J. Orthop. Res.* – 1994. – Vol. 12. – P. 485-497.
117. Henrotin, Y. Cartilage repair in osteoarthritic patients: Utopia or real opportunity? / Y. Henrotin, J. Dubuc // *F1000 Medicine Reports.* – 2009. – Vol. 1, № 88. – P. 1-3.
118. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees / S. Wakitani [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2002. – Vol. 10, № 3. – P. 199-206.

119. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells / H.E. Broxmeyer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 3828-3832.
120. Hvid, I. Perichondral autograft in traumatic chondromalacia patella / I. Hvid, L.I. Andersen // Acta Orthop. Scand. – 1981. – Vol. 52. – P. 91-93.
121. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis / I. Sekiye [et. al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. VSA. – 2002. – Vol. 99, № 7. – P. 4397-4402.
122. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells / C. Bevilacqua [et al.] // Tissue Eng. – 2008. – № 10. – P. 518-525.
123. In vitro mesenchymal chondrogenesis of bone marrow-derived progenitor cells / B. Johnstone [et al.] // Exp. Cell Res. – 1998. – Vol. 238. – P. 265-272.
124. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells / S. Shirasawa [et al.] // J. Cell Biochem. – 2006. – P. 84-97.
125. Insall, J.N. Surgery of the knee / J.N. Insall. – London : Churchill Livingstone, 1984 – 807 p.
126. Jordan, M. Treatment of Articular Cartilage Defects of the Knee With Microfracture and Enhanced Microfracture Techniques / M.C. Jordan, J. M. Jason // Scopp Sports Med. and Arthroscop. Rev. – 2016. – Vol. 24. - № 2. – P. 63-68.
127. Kheir, E. Management of articular cartilage defects / E. Kheir, D. Shaw // Orthopaedics and Trauma. – 2009. – Vol. 23, № 4. – P. 266-273.

128. Kim, H.T. Chondrocyte apoptosis: implications for osteochondral allograft transplantation / H.T. Kim, M.S. Teng, A.C. Dang // Clin. Orthop. – 2008. – Vol. 466, № 8. – P. 1819-1825.
129. Kirkley, A. A randomized trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee / A. Kirkley, T.B. Birmingham, R.B. Litchfield [et al.] // New Eng. J. Med. – 2008. – Vol. 359. – P. 1097-1107.
130. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature / D.L. Richer [et al.] // Sports Health . – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 153-160.
131. Knee cartilage defect: marrow stimulating techniques / M.Z. Mirza [et al.] // Curr. Rev. Musculoskelet. Med. – 2015. – Vol. 8. – №. 4. – P. 451-456.
132. Liangliang, X. Circulating mesenchymal stem cells and their clinical implications / X. Liangliang, L. Gang // J. Orthop. Translat. – 2014. – Vol. 2. – №. 1. – P. 1-7.
133. Local and remote matrix responses to chondrocyte-laden collagen scaffold implantation in extensive articular cartilage defects / A.E. Sams [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 1995. – Vol. 3. – P. 61-70.
134. MACI – a new era? / M. Jacobi [et al.] // Sports Med. Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 10.
135. Magnussen, R.A. Treatment of local articular cartilage defects in the knee: a systematic review / R.A. Magnussen, W.R. Dunn, J.L. Carey // Clin. Orthop. – 2008. – Vol. 466, № 4. – P. 952-962.
136. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study / E. Basad [et al.] // KSSTA. – 2010. – Vol. 18, № 4. – P. 519-527.

137. McGibbon, B. Use of Dacron backing on the cartilage framework in the construction of ears / B. McGibbon // *Plast. Reconstr. Surg.* – 1977. – Vol. 60. – P. 262-266.
138. Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering / D. Schumann [et al.] // *Biomed. Mater. Eng.* – 2006. – Vol. 16. – P. 37-52.
139. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. / S. Wakitani [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 1994. – Vol. 76. – P. 579-592.
140. Minimum ten-year results of a prospective randomized study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee / J. Bentley [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br.* – 2012. – Vol. 94. – P. 504-509.
141. Modis, L. The extracellular matrix of hyaline cartilage is not an amorphous system / L. Modis // *Biology of cartilage.* – 1983. – P. 56.
142. Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / N.S. Hwang [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 212. – P. 281-284.
143. MRI in the follow-up of matrix-supported autologous chondrocyte transplantation (MACI) and microfracture / G. Bachmann [et al.] // *Radiologe.* – 2004. – Vol.44, №8. – P. 773-82.
144. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: Expression of bone, fat, and neural markers / H.S. Goodwin [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2001. – Vol. 7. – P. 581-588.
145. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger [et al.] // *Science.* – 1999. – Vol. 284. – P.143-147.

146. Newman, A.P. Articular cartilage repair. Current concepts / A.P. Newman // Amer. J. of Sports Medicine. – 1998. – Vol. 26, № 2. – P. 309-332.
147. Osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts / S. L. Sherman // J. Am. Acad. Orthop. Surg. – 2014. – Vol. 22. – P. 121-133.
148. Osteonecrosis of the knee treated with a tissue-engineered cartilage and bone implant. A case report / N. Adachi [et al.] // J. Bone Jt. Surg. – 2007. – Vol. 89A, № 12. – P. 2752-2757.
149. Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry / J. Gille [et al.] // Arch. Orthop. Trauma Surg. – 2013. – Vol. 133, №1. – P. 87-93.
150. Outcomes of autologous chondrocyte implantation in study of the treatment of articular repair (STAR) patients with osteochondritis dissecans / B.J. Cole [et al.] // Am. J. Sports Med. – 2012. – Vol. 40. – P. 2015-2022.
151. Outerbridge, R. The etiology of chondromalacia patellae / R. Outerbridge // J. Bone Joint Surg. – 1961. – Vol. 43 – P. 752-757.
152. Pirdie, A. H. The method of resurfacing osteoarthritic knee joints / A. H. Pirdie // J. Bone Joint Surg. Br. – 1959. – Vol .41. – P. 613-618.
153. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures / M.M Caron [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2012. – Vol. 20, №10. – P. 1170-1178.
154. Return to Sports Participation After Articular Cartilage Repair in the Knee: Scientific Evidence / K. Mithoefer [et al.] // Am. J. Sports Med. November. – 2009. – Vol. 37. – P. 167-176.
155. Robinton, D.A. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy / D.A. Robinton, G.Q. Daley // Nature. – 2012. – Vol. 481. – P. 295-305.

156. Rosada, C. The human umbilical cord blood: A potential source for osteoblast progenitor cells / C. Rosada, J. Justesen, D. Melsvik // *Calcif. Tissue Int.* – 2003. – Vol. 72. – P. 135-142.
157. Safran, M.R. The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury / M.R. Safran, H. Kim, S. Zaffagnini // *J. Am. Acad. Orthopaedic. Surgeons.* – 2008. – Vol. 16. – P. 306-311.
158. Scaffold-based repair for cartilage healing: a systematic review and technical note / G. Filardo [et al.] // *Arthroscopy.* – 2013. – Vol. 29, №1. – P. 174-186.
159. Second generation issues in cartilage repair / E. Kon [et al.] // *Sports Med. Arthrosc.* – 2008. – Vol. 16, № 4. – P. 221-229.
160. Spongialization: a new treatment for diseased patellae / R. Ficat [et al.] // *Clin. Orthop.* – 1979. – Vol. 144. – P. 74-83.
161. Steadman, J.R. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11 year follow-up / J.R. Steadman [et al.] // *Arthroscopy.* – 2006. – Vol. 19. – P. 477-484.
162. Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration / F. Jiabing // *Tissue Engineering.* – 2009. – Vol. 15. - № 1. – P. 75-88.
163. T1, T2 and focal knee cartilage abnormalities in physically active and sedentary healthy subjects versus early OA patients a 3.0-Tesla MRI study / R. Stahl [et al.] // *Eur Radiol.* – 2009. – Vol.19, № 1. – P. 132-143.
164. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P.663-676.
165. Tetteh, E.S. Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee / E.S. Tetteh, S. Bajaj, N.S. Ghodadra // *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* – 2012. – Vol. 42, № 3. – P. 243-253.

166. The comparison of acellular dermal matrix (Alloderm), Dacron, Gore-Tex, and autologous cartilage graft materials in an experimental animal model for nasal septal repair surgery / F. Mola [et al.] // *Am. J. Rhinol.* – 2007. – Vol .21. – P. 330-334.
167. The John Insall Award: a minimum 10-year outcome study of autologous chondrocyte implantation / T. Minas [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2014. – Vol. – 472. – P. 41-51.
168. The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee: midterm results / M. Asik [et al.] // *Arthroscopy.* –2008. – Vol.11. – P. 1214-1220.
169. The natural history of cartilage defects in people with knee osteoarthritis / M.L. Vies-Tuck [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2008. – Vol. 16, № 3. – P. 337-342.
170. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair / F. Guilak [et al.] // *Clin. Orthop.* – 2004. – Vol. 423. – P. 17-26.
171. The Role of Immunologic Response in Fresh Osteochondral Allografting of the Knee / H. E. Hunt [et al.] // *Am. J. Sports. Med.* – 2014. – Vol. 42. - № 4. – P. 886-891.
172. The role of the synovium in repairing cartilage defects / A. Miyamoto [et al.] // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2007. – Vol. 15. – P. 1083-1093.
173. The surgical treatment of chondromalacia of the patella / J.R. McCarroll [et al.] // *Clin. Orthop.* – 1983. – Vol. 175. – P. 130-134.
174. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits / S.B. Cohen [et al.] // *Biomaterials.* – 2003. – Vol. 24. – P. 2653-2660.

175. The use of the Chondro-Gide membrane in autologous chondrocyte implantation / O. Haddo [et al.] // *Knee*. – 2004. – Vol. 11, № 1. – P. 51-55.
176. Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art / B. Johnstone // *Eur. Cell Mater.* – 2013. – Vol. 25. – P. 248-267.
177. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits / B. Rahfoth [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 1998. – Vol. 6. – P. 50-65.
178. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee / M. Ochi [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br.* – 2006. – № 4. – P. 571-578.
179. Treatment of a full-thickness articular cartilage defects in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells / R. Kuroda [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2007. – Vol. 15. – P. 226-231.
180. Treatment of articular cartilage lesions of the knee joint using a modified AMIC technique / A. Pascarella [et al.] // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2010. – Vol. 18. – P. 509-513.
181. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. / M. Brittberg [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – Vol. 33, № 14. – P. 889-895.
182. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle / L.A. Solchaga [et al.] // *Tissue Eng.* – 2002. – Vol. 8. – P. 333-347.
183. Treatment of patellofemoral cartilage defects utilizing a 3D collagen gel: two-year clinical results / S. Andereya [et al.] // *Z. Orthop. Unfall.* – 2007. – Vol. 145, № 2. – P. 139-45.
184. Treatment of unstable osteochondritis dissecans lesions of the knee using autogenous osteochondral graft (mosaicplasty) / G.C. Berlet [et al.] // *Arthroscopy*. – 1999. – Vol. 15. – P. 312-316.

185. Updates in biological therapies for knee injuries: full thickness cartilage defect / A. Nicolini [et al.] // *Curr. Revn. Musculoskelet. Med.* – 2014. – Vol. 7. – №3. – P.256-62.
186. Vasiliadis, H.S. Autologous chondrocyte implantation for the treatment of cartilage lesions of the knee: a systematic review of randomized studies. / H.S. Vasiliadis, J. Wasiak, G. Salanti // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2010. – Vol. 18. – P. 1645-1655.
187. Viability of chondrocytes seeded onto a collagen I/III membrane for matrix-induced autologous chondrocyte implantation / C. Andrew [et al.] / *J. Orthop. Res.* – 2014. – Vol. 32. - № 11. – P. 1495-1502.
188. Viscoelastic behavior of nano-hydroxyapatite reinforced poly (vinyl alcohol) gel biocomposites as an articular cartilage / Y. Pan [et al.] // *J. Mater Sci. Mater Med.* – 2008. – Vol. 19 – 1963-1969.
189. Yan, H. Repair of Full-Thickness Cartilage Defects With Cells of Different Origin in a Rabbit Model / H. Yan, C. Yu // *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.* – 2007. – Vol. 23, № 2. – P.178-187.
190. Zanasi, S. Basic Science, Clinical Repair & Reconstruction of Articular Cartilage Defects: Current Status & Prospects / S. Zanasi, M. Brittberg, M. Marcacci. – Timeo Editore SRL, 2006. – 1200 p.
191. Zeng, L. Osteochondral autograft transplantation or autologous chondrocyte implantation for large cartilage defects of the knee: a meta-analysis / L.Zeng, T. Zhu, F. Weimin // *Cell and Tissue Banking.* – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 59-67.

ПРИЛОЖЕНИЯ.

Приложение 1. Шкала Joseph & Kaufman

Результаты оцениваются от 0 до 100, где 0 это минимальное значение, а 100 максимальное. Результат:

- 90-100 отличный
- 80-89 хороший
- 60-79 удовлетворительный
- менее 60 неудовлетворительный

Признак		Баллы	
БОЛЬ (50 баллов)	При ходьбе	Нет боли	35
		незначительная	30
		выраженная	10
		Делающая ходьбу невозможной	0
	В покое	нет боли	15
		Незначительная	10
		умеренная	5
		сильная	0
ФУНКЦИЯ (24 балла)	Дистанция ходьбы	за пределами квартиры не ограничена	6
		за пределами квартиры, но ограничена	4
		только по квартире	1
		не способен к ходьбе	0
	Ходьба по	нормальная вверх и вниз с	6

	лестнице	поддержкой или без поддержки за перила		
		шаг на ступеньку во время опоры на перила	4	
		на одну ступеньку во время опоры на перила с дополнительным подтягиванием за них	0	
	Подъем со стула	может подняться без помощи	6	
		может подняться с дополнительной опорой на одну или обе руки	4	
		поднимается с трудом при помощи рук	3	
		подъем при помощи другого человека	1	
		не может подняться даже с чьей-либо помощью	0	
	Дополнительная опора при ходьбе	нет	6	
		трость иногда (от случая к случаю)	5	
		один костыль или трость постоянно	3	
		два костыля или не способен ходить	1	
	АМПЛИТУДА ДВИЖЕНИЙ (14 баллов)	Активные движения (7 баллов)	110 и больше	7
			100-109	6
			90-99	5

		70-89	3
		меньше 70	0
	Пассивные движения (7 баллов)	110 и больше	7
		100-109	6
		90-99	5
		70-89	3
		меньше 70	0
Деформация (5 баллов)	0-5 градусов		5
	6-15 градусов		3
	более 15 градусов		0
МЫШЕЧНАЯ СИЛА (3 балла)	нельзя преодолеть сопротивление четырехглавой мышцы		3
	можно преодолеть сопротивление четырехглавой мышцы		2
	может совершать активные движения по всей возможной амплитуде		1
	не может совершать активные движения по всей возможной амплитуде		0
НЕСТАБИЛЬНОСТЬ БОКОВЫХ СВЯЗОК (3 балла)	нет фронтальной нестабильности		3
	небольшая (менее 5)		2
	умеренная (5-15)		1
	выраженная (более 15)		0
ПЕРЕДНЕЗАДНЯЯ СТАБИЛЬНОСТЬ (1 балл)	стабильный сустав		1
	нестабильный сустав		0

Приложение 2. Общие сведения о лабораторных животных.

Кролик/Кличка	Пол	Вес, гр	Оперированных суставов	Дата введения в эксперимент	Дата выведения из эксперимента	Продолжительность эксперимента
№1	Муж	3700	2	09.04.2014	09.10.2014	6 месяцев
№2	Жен	3500	2	09.04.2014	09.10.2014	6 месяцев
№3	Жен	4500	1	11.04.2014	-	-
№4	Муж	3850	1	11.04.2014	-	-
№5	Жен	2950	1	12.05.2015	14.08.2015	3 месяца
№6	Жен	2900	1	12.05.2015	14.08.2015	3 месяца
№7	Муж	4700	2	03.12.2014	04.03.2015	3 месяца
№8	Муж	5300	2	03.12.2014	06.06.2015	6 месяцев
№9	Муж	5000	2	03.12.2014	03.03.2015	3 месяца
№10	Муж	5000	2	19.12.2014	19.03.2015	3 месяца
№11	Жен	5000	1	14.01.2015	18.06.2015	6 месяцев
О-1	Муж	5400	2	16.06.2015	16.09.2015	3 месяца
О-2	Муж	5500	2	16.06.2015	16.09.2015	3 месяца
О-3	Муж	5300	2	16.06.2015	16.12.2015	6 месяцев
О-4	Жен	5200	2	16.06.2015	16.09.2015	3 месяца
О-5	Муж	5500	2	16.06.2015	16.12.2015	6 месяцев
О-6	Муж	5600	2	16.06.2015	16.12.2015	6 месяцев
Ch-G-1	Жен	3700	2	14.10.2015	14.01.2016	3 месяца
Ch-G-2	Муж	4200	2	14.10.2015	14.01.2016	3 месяца
Ch-G-3	Жен	4500	2	14.10.2015	14.01.2016	3 месяца
Ch-G-4	Муж	4300	2	14.10.2015	14.04.2016	6 месяцев
Ch-G-5	Жен	3800	2	14.10.2015	14.04.2016	6 месяцев
Ch-G-6	Муж	3700	2	14.10.2015	14.04.2016	6 месяцев

Животные №3 и №4 контрольной группы погибли во время эксперимента, их данные не включены в результаты исследования.

Приложение 3. Значения коэффициента восстановления в исследуемых срезах.

№ - номер исследуемого среза;

КВ - коэффициент восстановления.

Коэффициент восстановления сформированного дефекта в контрольной группе.

(Срок наблюдения – 6 месяцев)

№	КВ
1	0,56
2	0,59
3	0,64
4	0,61
5	0,72
6	0,54
7	0,58
8	0,64
9	0,57
10	0,61
11	0,59
12	0,68
13	0,57
14	0,58
15	0,54
16	0,61
17	0,57
18	0,61

19	0,66
20	0,71
21	0,53
22	0,61
23	0,67
24	0,7
25	0,62
26	0,67
27	0,72
28	0,58
29	0,64
30	0,72
31	0,61
32	0,71
33	0,54
34	0,62
35	0,71
M ± σ	0,62±0,06

Коэффициент восстановления сформированного дефекта в группе Опыт

1

(БМКП: СККМ+«Chondro Gide», срок наблюдения – 3 месяца)

№	КВ
1	0,54
2	0,56
3	0,58
4	0,57
5	0,55
6	0,53
7	0,55
8	0,52
9	0,56
10	0,54
11	0,58
12	0,71
13	0,54
14	0,68
15	0,53
16	0,75
17	0,56
18	0,54

19	0,53
20	0,59
21	0,61
22	0,58
23	0,56
24	0,57
25	0,56
26	0,58
27	0,57
28	0,55
29	0,58
30	0,54
M ± σ	0,57±0,05

**Коэффициент восстановления сформированного дефекта в группе Опыт
1**

(БМКП: СККМ+«Chondro Gide», срок наблюдения – 6 месяцев).

№	КВ
1	0,73
2	0,73
3	0,77

4	0,72
5	0,74
6	0,72
7	0,87
8	0,74
9	0,72
10	0,73
11	0,86
12	0,74
13	0,85
14	0,72
15	0,86
16	0,85
17	0,73
18	0,85
19	0,72
20	0,86
21	0,85
22	0,86
23	0,72

24	0,86
25	0,71
26	0,85
27	0,86
28	0,86
29	0,85
30	0,86
M ± σ	0,79±0,07

Коэффициент восстановления сформированного дефекта в группе Опыт 2.

(БМКП: СККМ+«Остеопласт», срок наблюдения – 3 месяца)

№	КВ
1	0,80
2	0,81
3	0,71
4	0,71
5	0,87
6	0,85
7	0,74
8	0,85

9	0,77
10	0,74
11	0,76
12	0,82
13	0,83
14	0,79
15	0,81
16	0,78
17	0,77
18	0,76
19	0,80
20	0,79
21	0,77
22	0,82
23	0,83
24	0,80
25	0,78
26	0,81
27	0,82
28	0,79

29	0,78
30	0,81
М ± σ	0,79±0,04

**Коэффициент восстановления сформированного дефекта в группе Опыт
2.**

(БМКП: СККМ+«Остеопласт», срок наблюдения – 6 месяцев)

№	КВ
1	0,90
2	0,91
3	0,87
4	0,88
5	0,91
6	0,87
7	0,89
8	0,88
9	0,91
10	0,89
11	0,82
12	0,85
13	0,90

14	0,87
15	0,89
16	0,88
17	0,91
18	0,87
19	0,89
20	0,90
21	0,87
22	0,89
23	0,86
24	0,90
25	0,88
26	0,88
27	0,85
28	0,89
29	0,88
30	0,89
M ± σ	0,88±0,02