

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Лазарев Владимир Анатольевич

**ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ
ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ ДЛЯ ХОНДРОПЛАСТИКИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.8 – Травматология и ортопедия

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор Г.П. Котельников

Самара – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1.Современные представления об эффективности применения обогащенной тромбоцитами плазмы в травматологии и ортопедии.....	11
1.2. Моделирование патологий суставной поверхности в экспериментальных исследованиях.....	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Дизайн исследования.....	30
2.2. Методы исследования.....	32
ГЛАВА 3. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫПОЛНЕНИЮ ХОНДРОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ И К ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПЕРАЦИИ.....	44
3.1. Методика получения и применения для хондропластики обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов	45
3.2. Новый способ оценки качества регенератов после хондропластики с помощью компьютерной томографии.....	52
3.3. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки спектральных характеристик суставной поверхности человека и животных....	57
ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАЗНЫХ ВИДОВ ХОНДРОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ	69
4.1. Оценка результатов клинического исследования.....	69
4.2. Анализ результатов термографии и рентгенографии.....	73
4.3. Сравнение результатов компьютерной томографии.....	77
4.4. Оценка макропрепаратов коленных суставов.....	84
4.5. Анализ результатов микроскопического исследования.....	94
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ВИДОВ ХОНДРОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ	

ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	140
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По данным последнего крупного обзора “Large Database and Registry Research in Joint Arthroplasty and Orthopaedics», опубликованного в октябре 2022 года в «The Journal of Bone and Joint Surgery», проблема лечения пациентов с повреждениями и деструктивно-дистрофическими поражениями суставной поверхности остаётся актуальной. Социальная значимость помощи этим больным обусловлена не только высокой стоимостью конечной операции – эндопротезирования сустава, но и консервативного лечения – в частности, внутрисуставных инъекций препаратов гиалуроновой кислоты, хондропротекторов, кортикостероидов, использования ортопедических фиксаторов (Swiontkowski, Marc F., Callaghan, John J et al, 2022).

Помимо вышеперечисленных элементов консервативного лечения таких пациентов существует возможность использования собственных резервов организма – аутологичных факторов, обладающих противовоспалительным, иммуномодулирующим, регенеративным эффектом. К таким факторам, безусловно, можно отнести аутологичную обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) (А.Л. Емелин, И.Ф. Ахтямов, 2013; W. L. Dai, A. G. Zhou et. al., 2017).

Использование ОТП в последнее десятилетие нашло широкое применение в отечественной травматологии и ортопедии. Помимо внутрисуставного введения аутоплазмы при лечении пациентов с остеоартрозом, ее применяют для лечения больных с тендинопатиями, грыжами межпозвонковых дисков и других патологиях (Д.А. Маланин с соавт., 2018; В.Г. Самодай с соавт., 2020; Migliorini F., Driessen A. et. al., 2021).

С развитием артроскопической малоинвазивной хирургии появилась возможность использования для замещения дефектов суставной поверхности различных биоматериалов (К.А.Егиазарян, Г.Д. Лазишвили, 2018; Krych A.J. et al., 2020) Представляет интерес изучение эффективности ОТП для непосредственной

пластики дефектов суставной поверхности, а также возможность её использования в комбинации с известными материалами для хондропластики.

Степень разработанности темы исследования

При достаточно большом разнообразии клинических исследований подходы к получению ОТП, характеристике продукта, фракций, методикам применения ОТП и результаты лечения пациентов достаточно сильно разнятся (Giannini S., Cielo A. et. al., 2015; Alves R., Grimalt R. et. al., 2018).

Известно много как отечественных, так и зарубежных работ по использованию ОТП для внутрисуставных инъекций при лечении остеоартроза. В то же время публикаций, касающихся её применения интраоперационно не так много (М.А. Малыгина, Н.В. Боровкова, 2017; С.В. Рябинин, 2018; С.Г. Чесников с соавт, 2018; Bennell K., Hunter D., 2017; Filardo G., Previtalli D., 2021).

Доклинические исследования изучения эффективности ОТП для пластики дефектов суставной поверхности предполагают создание в эксперименте у животных моделей патологических процессов, в частности, повреждений и деструктивно-дистрофических процессов в суставах. Подобные модели известны, однако существуют определенные сложности – получение достаточного объема ОТП, трудность прижизненной оценки эффективности восстановления суставной поверхности. Разработка новых, совершенствование известных методов инструментальной диагностики у животных способно решить эту проблему.

Данная работа посвящена решению этих актуальных задач.

Цель работы

Оценить эффективность применения обогащенной тромбоцитами плазмы для хондропластики полнослойных дефектов суставной поверхности у кроликов в эксперименте.

Задачи исследования

1. Разработать методику получения обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов и применить её при выполнении хондропластики.

2. Предложить и апробировать в экспериментальном исследовании новый способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики с помощью компьютерной томографии.

3. Оценить возможности применения рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния для качественной оценки спектрального состава суставной поверхности у человека и животных в норме и при патологии.

4. Сравнить результаты монопластики костно-хрящевых дефектов деминерализованным костным материалом, обогащенной тромбоцитами плазмой и их комбинацией с оценкой клинических, инструментальных и морфологических показателей в динамике.

5. Оценить эффективность разных видов пластики костно-хрящевых дефектов суставной поверхности у кроликов в эксперименте с позиции доказательной медицины.

Научная новизна

Впервые предложен способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики у кроликов при выполнении компьютерной томографии (Патент РФ на изобретение № 2727002 от 17.07.2020).

Применена рамановская спектроскопия комбинационного рассеяния для оценки спектральных характеристик суставной поверхности костей, резецированных при эндопротезировании коленного сустава у человека и после выполнения хондропластики в экспериментальном исследовании у животных.

Впервые разработано устройство для получения тромбоцитарных фракций крови для применения в клинической практике (Патент РФ на изобретение № 2736004 от 11.11.2020).

Проанализирована эффективность монопластики костно-хрящевых дефектов деминерализованным костным материалом, обогащенной тромбоцитами плазмой и их комбинацией с оценкой клинических, инструментальных и морфологических показателей с позиции доказательной медицины.

Теоретическая и практическая значимость работы

Для выполнения экспериментальных доклинических исследований у животных предложен удобный, объективный способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики с помощью компьютерной томографии, позволяющий оценить как общую плотность регенерата, так и дать характеристику новообразованной ткани на разных уровнях – гиалинового хряща, субхондральной кости.

Рамановская спектроскопия комбинационного рассеяния позволяет проводить быстрый неинвазивный контроль состояния суставной поверхности человека и животных с достоверным выявлением локальных участков поражения гиалинового хряща; с возможностью получения спектральных характеристик поверхности новообразованной ткани, замещающей дефекты.

В доклиническом экспериментальном исследовании доказана эффективность и безопасность применения обогащенной тромбоцитами плазмы для замещения дефектов суставной поверхности, как в качестве мономатериала, так и в комбинации с аллогенным костным биоматериалом.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология диссертационной работы построена на изучении и обобщении литературных данных по результатам применения в экспериментальных и клинических исследованиях в травматологии и ортопедии обогащенной тромбоцитами плазмы. Разработке дизайна экспериментального исследования, протокола получения и оценке эффективности применения обогащенной тромбоцитами плазмы при разных видах хондропластики, в том числе с применением оригинальных подходов к инструментальным методам исследования.

Объектами работы стали 53 разнополых кролика породы «Шиншилла». В эксперименте использованы инструментальные, морфологические методы исследования. Математическую обработку данных проводили с использованием

программы «Excel», «Office XP» (Microsoft Corp., США) и компьютерным приложением «STATISTICA 10.0».

Положения, выносимые на защиту

1. Аутологичная обогащенная тромбоцитами плазма может быть применена для замещения полнослойных дефектов суставной поверхности как в качестве мономатериала, так и в комбинации с аллогенным деминерализованным костным биоматериалом.

2. Новый способ оценки эффективности хондропластики с помощью компьютерной томографии и рамановская спектроскопия комбинационного рассеяния могут быть использованы в динамике для качественной и количественной характеристики новообразованной ткани регенератов и скрининга состояния суставной поверхности.

3. Применение аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы и её комбинации с аллогенным костным биоматериалом для хондропластики приводит к сравнимым результатам – полноценному восполнению костно-хрящевых дефектов органотипичной тканью регенератов.

Степень достоверности исследования

Достоверность научных выводов и положений основана на достаточном по количеству доклиническом материале, современных методах исследования и статистической обработке данных. Полученные результаты проанализированы с помощью традиционных методов описательной статистики с использованием вариационного, регрессионного, дисперсионного, системного многофакторного анализа с позиции доказательной медицины.

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на ежегодных научно практических конференциях с международным участием «Аспирантские чтения – 2018», «Аспирантские чтения – 2019» (г. Самара), Всероссийской

научно-практической конференции «Технологические инновации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии. Интеграция науки и практики» (г. Саратов, 25-26 апреля 2019 г.), международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы регенеративной медицины: клеточные технологии, тканевая инженерия» (г. Самара, 20-21 мая 2021 г.).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используют при выполнении доклинических экспериментальных исследований у животных на базе Института экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; в учебном процессе на кафедре травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Диссертант участвовал в планировании дизайна экспериментального исследования, его проведении на всех этапах работы: отборе животных, их обследовании, выполнении оперативных вмешательств; динамическом наблюдении и сборе разнородных инструментальных и морфологических данных в послеоперационном периоде. Автор принимал участие в проведении статистической обработки данных, внедрении результатов диссертационного исследования в учебный процесс и доклинические исследования.

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательской работы университета

Работа выполнена в рамках комплексной научно-исследовательской темы кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: «Диагностика и лечение патологии опорно-двигательной системы, в том числе с использованием биофизических факторов и биотехнологий, а также персонифицированного

подхода к пациенту» (регистрационный номер научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы АААА-А19-119122590099-8, дата регистрации 25.12.2019).

Соответствие паспорту специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.1.8. Травматология и ортопедия: экспериментальная и клиническая разработка методов лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательной системы и внедрение их в клиническую практику.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 23 научные работы, из них 3 статьи – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования РФ и 3 статьи – в журналах, индексируемых в библиографической базе данных SCOPUS. Получены 2 патента РФ на изобретения.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который включает в себя 200 источников, в том числе 59 работ отечественных и 141 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 67 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления об эффективности применения обогащенной тромбоцитами плазмы в травматологии и ортопедии

Впервые о возможностях использования обогащенной тромбоцитами аутоплазмы стало известно в 70-е годы XX века гематологам, которым принадлежит пальма первенства в обозначении термина PRP для описания плазмы с количеством тромбоцитов выше, чем в периферической крови. Данный продукт широко применяли для трансфузий при лечении пациентов с тромбоцитопениями.

Десять лет спустя, PRP начали использовать в челюстно-лицевой хирургии как PRF. Фибрин обладал потенциалом адгезии и гомеостатическими свойствами, а PRP с его противовоспалительными свойствами стимулировал пролиферацию клеток. До сих пор обогащенная тромбоцитами плазма находит широкое применение в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Гораздо позднее PRP стали применять для лечения патологий опорно-двигательной системы и в спортивной травматологии [36, 44, 68, 99,118].

Альфа-гранулы тромбоцитов представляют собой резервуар критических факторов роста GF, а также цитокинов, хемокинов и многих других белков. Их плотные гранулы хранят АДФ, АТФ, ионы кальция, гистамин, серотонин и дофамин. Тромбоциты также выделяют антибактериальные и фунгицидные белки, защищающие от инфекций [16, 84, 98, 119,128].

Тромбоцитарные концентраты, таким образом, являются простым, недорогим и минимально инвазивным способом получения естественной концентрации биоактивных молекул. Преимущества, связанные с коктейлем из этих молекул - их аутологичная природа, отсутствие побочных эффектов, характерных для других распространенных фармацевтических препаратов, имеющих в арсенале хирурга [17, 54, 77, 109,133].

Использование ОТП в последнее десятилетие нашло широкое применение в отечественной и зарубежной травматологии и ортопедии, спортивной медицине

Помимо внутрисуставного введения аутоплазмы при лечении пациентов с остеоартрозом, ее применяют для лечения больных с тендинопатиями, грыжами межпозвонковых дисков и других патологиях (Д.А. Маланин с соавт., 2018; В.Г. Самодай с соавт., 2020; Migliorini F., Driessen A. et. al., 2021).

Безусловно, наиболее частыми и популярными клиническими исследованиями стали исследования эффективности ОТП для лечения пациентов с деструктивно-дистрофическими заболеваниями [56, 74, 88, 162,188]. В последнее время прогрессивно нарастает количество сравнительных исследований применения ОТП, хондропротекторов, производных гиалуроновой кислоты для лечения деструктивно-дистрофических процессов [16, 24, 28,39,44].

В 2020 года группой исследователей Filardo G., Previtali D. С соавторами был проведен метаанализ исследований в PubMed, Cochrane Library, Scopus, Embase, Web of Science, касающийся эффективности применения ОТП. Рандомизированные контролируемые испытания (РКИ), сравнивающие инъекции PRP с плацебо или другими инъекционными методами лечения, на любом языке, люди, были включены в данную работу. Риск систематической ошибки оценивали в соответствии с Кокрановскими рекомендациями; качество доказательств оценивали с использованием рекомендаций GRADE.

Было отобрано 34 РКИ, в том числе 1403 коленных сустава в группах PRP и 1426 в контрольных группах. Оценка WOMAC показала предпочтение PRP со статистически и клинически значимой разницей по сравнению с плацебо через 12 месяцев наблюдения ($P = 0,02$) и по сравнению с инъекциями гиалуроновой кислоты через 6 месяцев ($P < 0,001$).) и 12 месяцев ($P < 0,001$) наблюдения.

Клинически значимое различие в пользу PRP по сравнению со стероидами было документально подтверждено для боли по ВАШ (визуально-аналоговая шкала) ($P < 0,001$), боли по KOOS ($P < 0,001$), функции в повседневной деятельности ($P = 0,001$) и оценке качества жизни ($P < 0,001$) при последующем наблюдении через 6 месяцев.

Однако превосходство PRP не достигало минимальной клинически значимой разницы для всех исходов, а качество доказательств было низким. Авторы сделали вывод, что действие концентратов тромбоцитов выходит за рамки простого эффекта плацебо, а инъекции PRP дают лучшие результаты, чем другие варианты внутрисуставных инъекций. Это преимущество увеличивается со временем, будучи незначительным при более ранних наблюдениях, но становится клинически значимым через 6–12 месяцев. Однако, несмотря на существенное улучшение, оно остается частичным и подтверждается низким уровнем доказательности.

В 2021 году группой ученых Park Y.B., Kim J.H. et. al. было выполнено рандомизированное двойное слепое контролируемое клиническое исследование по сравнению эффективности внутрисуставного введения ОТП с гиалуроновой кислотой. В общей сложности 110 пациентов с симптоматическим остеоартритом коленного сустава получили однократную инъекцию богатой лейкоцитами PRP или гиалуроновой кислоты.

Клинические данные оценивали исходно, а также через 6 недель и 3 и 6 месяцев после инъекции. Первичной конечной точкой было улучшение субъективной оценки IKDC через 6 месяцев, а вторичными конечными точками были улучшения в баллах, основанных на общей оценке пациента, визуальной аналоговой шкале (ВАШ) боли, шкале Западного Онтарио и Индекса остеоартрита McMaster Universities и пателлофemorальной оценке Медицинского центра Samsung. Количество клеток и концентрации факторов роста и цитокинов в инъецированном PRP оценивали для определения их связи с клиническими исходами.

PRP показала значительное улучшение субъективных показателей IKDC через 6 месяцев (11,5 в группе PRP против 6,3 в группе HA; $P = 0,029$). По другим клиническим исходам существенных различий между группами не было. Общая оценка пациента через 6 месяцев была лучше в группе PRP ($P = 0,035$). Доля

пациентов, у которых оценка по ВАШ через 6 месяцев превышала минимальную клинически значимую разницу (MCID), была значительно выше в группе PRP ($P = 0,044$). В группе PRP концентрация тромбоцитарных факторов роста была высокой у пациентов с баллом выше MCID по ВАШ через 6 месяцев. Частота нежелательных явлений не отличалась между группами ($P > 0,05$).

Таким образом, PRP имела лучшую клиническую эффективность, чем инъекции гиалуроновой кислоты. Высокие концентрации факторов роста наблюдались у пациентов, которые набрали больше MCID для клинических исходов в группе PRP. Эти результаты показывают, что необходимо учитывать концентрацию факторов роста для будущих исследований PRP при остеоартрите коленного сустава.

В последнее время появляются работы по использованию ОТП в комплексе операции хондропластики, в частности совместного применения с хрящевыми клетками – либо предварительного совместного культивирования, либо создания интраоперационной комбинации. Также есть ряд работ, в которых ОТП применяют вместе с другими пластическими материалами, но, как правило в виде инъекции в процессе операции или в послеоперационном периоде [101, 165, 178, 185, 194].

Так, в 2021 году появилось исследование Pötter N, Westbrook F et. al. по исследованию возможностей PRP в качестве адъювантной терапии к имплантации аутологичных хондроцитов (ACI) в сочетании с многоосевой нагрузкой для изучения регенерации хряща. ACI расширенные монослойные хондроциты человека были высеяны в полиуретановые каркасы и встроены в фибрин (hChondro), в PRP-гель (PRP) или в фибрин с лизатом тромбоцитов (PL), который добавляли в среду один раз в неделю с концентрацией 50 об.%.

Группы подвергались воздействию статических условий или многоосевых сил в биореакторе с шаровым шарниром в течение 1 часа в день в течение 2 недель, имитируя ACI при физиологической нагрузке. Культуральную среду собирали и

анализировали на содержание гликозаминогликанов (GAG), нитритов и трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β 1). Конструкции клеточного каркаса собирали для количественного определения ДНК и ГАГ; экспрессию хондрогенных генов, TGF- β и родственных рецепторов, а также воспалительных генов анализировали с помощью количественной ПЦР.

Условия нагрузки показали более высокую хондрогенную дифференцировку (усиление экспрессии COL2A1, ACAN, COMP и PRG4), чем статические условия. Группы PRP и PL в сочетании с механической нагрузкой показали активацию COL2A1, ACAN и COMP. Наибольшее количество общего TGF- β 1 было количественно определено в группе PL. Латентный TGF- β 1 был активирован во всех нагруженных группах, в то время как наибольшее количество было обнаружено в группе PL.

На основании этих экспериментов исследователи пришли к выводу, что хондрогенная дифференциация наиболее сильна, когда ACI выполняется в сочетании с динамической механической нагрузкой и добавлением PRP-геля или PL. Воспалительная реакция была уменьшена с помощью PRP и PL, что может быть одним из основных терапевтических эффектов. Нагрузка предположительно может усиливать действие TGF- β 1, который преимущественно активировался в нагруженных группах PL.

Существует достаточно много исследований, где ОТП служит в качестве стимулирующей среды для активизации клеток с целью их дальнейшей хондропластики. Li H, Sun S et. al. в 2016 провели исследование, направленное на оценку нового метода использования биологического реактора с богатой тромбоцитами плазмой для создания тканеинженерной кости.

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга бигля (СКМСК) были выделены и дифференцированы в остеобласты и хондробласты с использованием обогащенной тромбоцитами плазмы и каркасов из трикальцийфосфата, культивируемых в биореакторе в течение 3 недель. Композиты клеточного

каркаса исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и имплантировали гончим с дефектами суставного хряща.

Экспрессию остеогенных маркеров, щелочную фосфатазу и костный γ -карбоксиглутаматный белок (BGLAP) оценивали с помощью полимеразной цепной реакции через 3 месяца. Образцы суставного хряща исследовали гистологически. Адгезия и распределение СККМ на каркасе из β -трикальцийфосфата (β -TCP) были подтверждены с помощью СЭМ. Гистологическое исследование показало, что в естественных условиях костные дефекты были в значительной степени устранены через 12 недель после имплантации. Уровни экспрессии щелочной фосфатазы (ALP) и BGLAP в экспериментальных группах были значительно повышены по сравнению с отрицательным контролем.

СККМ могут быть оптимальными затравочными клетками для тканевой инженерии при восстановлении костей. Обогащенная тромбоцитами плазма (PRP) обеспечивает богатый источник цитокинов, способствующих функционированию СККМ. Каркас β -TCP выгоден для тканевой инженерии благодаря своей биосовместимости и трехмерной структуре, которая способствует адгезии, росту и дифференцировке клеток. Тканеинженерная кость была сконструирована в биореакторе с использованием СККМ, каркасов β -TCP и PRP и продемонстрировала соответствующую морфологию и биологическую функцию.

Ранее группой ученых Qi YY, Chen X et. al. было поведено исследование, которое было направлено на изучение того, может ли трансплантация аутологичной богатой тромбоцитами плазмы в коллагеновую матрицу улучшить восстановление хряща *in situ*, инициированное костным мозгом. В качестве модели восстановления хряща *in situ* были выбраны полнослойные хрящевые дефекты (диаметр 4 мм, толщина 3 мм) в надколенных бороздах самцов новозеландских белых кроликов. Они получали двухслойный коллагеновый каркас (группа II), PRP и двухслойный коллагеновый каркас (группа III) и не

лечились (группа I) соответственно ($n = 11$). Кроликов забивали через 6 и 12 недель после операции.

Результаты показали, что аутологичная PRP и двухслойный коллагеновый матрикс стимулировали образование хрящевой ткани. Полученные данные показали, что комбинация PRP с коллагеновой матрицей может восстанавливать более крупные дефекты хряща, которые в настоящее время требуют сложной имплантации аутологичных хондроцитов (ACI) или костно-хрящевой пластики.

Для изучения эффективности применения новых факторов в лечении пациентов с патологией суставной поверхности необходимо выполнение доклинических исследований у животных. Для адекватного воспроизведения патологического процесса необходимо грамотное планирование экспериментального исследования. Выбор животного, условий его содержания, питания. Выбор суставов для создания модели избранной для изучения патологии, разработка и реализация самой модели.

Безусловно, успешная интерпретация результатов исследования невозможна без знания нормальной анатомии, морфологии изучаемых структур, функции сустава в норме. Наша работа также представляет собой доклиническое исследование по оценке эффективности применения ОТП для хондропластики. Поэтому в следующем разделе мы сочли необходимым рассмотреть известные способы моделирования повреждений и деструктивно-дистрофических патологий суставной поверхности.

1.2. Моделирование патологий суставной поверхности в экспериментальных исследованиях

Большой интерес к экспериментальным моделям патологий суставной поверхности объясняется широкой распространенностью и высокой социальной значимостью этой патологии. В настоящее время существует большое разнообразие моделей, которые отличаются выбором вида животного, сустава, способами создания, сроками формирования, тяжестью и динамикой развития патологических процессов.

В литературе описаны многочисленные способы моделирования дистрофических и деструктивных поражений в суставах. Можно выделить следующие основные варианты моделирования патологий суставной поверхности.

1. Внутрисуставное введение повреждающих агентов
2. Опосредованное воздействие на сустав, в том числе с применением физических факторов.
3. Механические повреждения анатомических структур.
4. Модели спонтанного остеоартроза.

Две первые группы методов моделирования отличаются с одной стороны простотой исполнения, а с другой - нередко длительным развитием деструктивно-дистрофического процесса, либо напротив одномоментным развитием тяжелых деструктивных изменений в суставе. Третья группа включает в основном хирургические способы моделирования остеоартроза, которые нередко травматичны и сложны в исполнении.

Внутрисуставное введение повреждающих агентов

Исторически это самая ранняя группа способов моделирования деструктивно-дистрофических процессов в суставах у животных. Так, известно моделирование асептического некроза головки бедренной кости путем введения в тазобедренный сустав папаина (Moriizumi T. et al., 1986); полиэтилена (Mitrovic D. et al, 1985); осмиевой кислоты (Okada J, 1986).

В Таблице 1 представлены модели патологий суставной поверхности, созданные путем внутрисуставного введения разным видам животным разных повреждающих агентов. Группа методов по внутрисуставному введению веществ, вызывающих деструктивные процессы остается актуальной и в наше время. Так в работе Seung-Ah Y. et al. описан способ моделирования остеоартроза двукратным внутрисуставным введением мышам 1 ед. коллагеназы VII (из *Clostridium histolyticum*) с интервалом в 2 дня (2007). У Baragi V. M. et al. экспериментальная

модель основана на введении в коленный сустав кролика натриевой соли моноидуксусной кислоты (2009).

Таблица 1. Моделирование деструктивно-дистрофических заболеваний путем внутрисуставного введения веществ

Вид животного	Повреждающий агент	Авторы модели
Цыплята	Иодоацетат	Kalbhen D.A, 1987
Кролики	Папаин	Marcelon G. et al., 1976; Coulais Y. et al., 1983; Coulais Y. et al., 1984
Морские свинки	Папаин	Tanaka H. Et al., 1992
Собаки	Химопапаин	Leipold H.R. et al., 1989
Мыши	Папаин	van der Kraan P.M. et al., 1989
Мыши	Коллагеназа	van der Kraan P.M. et al., 1989
Мыши	ТФР-Р	van den Berg W.B., 1995
Кролики	Гипертонический раствор NaCl	Vasilev V. Et al., 1992

Способ, предложенный В.М. Коваленко с соавт. (2007) является ярким примером быстрого формирования тяжелых деструктивно-дистрофических изменений в суставе. Он заключается в двукратном введении в сустав лабораторных крыс витамина А из расчета 13,5-13,9 мг на 1 кг массы тела. Помимо деструктивных изменений способ обеспечивает длительный воспалительный процесс в суставе.

Не менее травматичным является комбинированный способ создания модели деформирующего артроза коленного сустава у кролика путем криовоздействия парами жидкого азота (В.О. Ткачев с соавт.). Животным проводят артротомию с последующим распылением паров жидкого азота над суставными поверхностями и замораживанием до -10°C . По данным авторов, после криовоздействия возникали обширные полнослойные дефекты суставной поверхности.

Существует множество модификаций способов по моделированию патологий суставной поверхности путем введения в сустав животных препаратов из группы глюкокортикоидов. Для этих целей применяют преднизолон, дексаметозон, кортизон, гидрокортизон и другие препараты. Один из таких способов был предложен самарскими учеными (Патент РФ на изобретение № 2237928 от 10.10.2004 «Способ моделирования артроза», авторы Г.П. Котельников, С.Н. Измалков, Ю.В. Ларцев).

Проводят подготовку коленного сустава кролика - выстригают волосяной покров и обрабатывают кожу 5% раствором йода. Пункцируют коленный сустав и инъекционным шприцом вводят 0,5 мл раствора дексаметазона (2 мг). Сустав не фиксируют. Через сутки после повторной обработки кожных покровов в коленный сустав тем же способом вводят взвесь медицинского талька 0,3 мг в 1 мл физиологического раствора.

По данным авторов, через 1 месяц в коленном суставе кролика развивались деструктивно-дистрофические процессы, соответствующие характеристикам II-III стадии деформирующего артроза у людей. Сначала отмечали деструктивные изменения в суставной капсуле, ворсинах синовиальной оболочки, затем дистрофические изменения наблюдали и в гиалиновом хряще.

Известно также изолированное применение суспензии хирургического талька для внутрисуставного введения (Патент РФ на изобретение № 2126176 «Способ создания модели деформирующего артроза коленного сустава у животных», Н.В. Корнилов с соавт.). Кролику в коленный сустав под надколенник иглой для спинно-мозговой пункции вводят 0,5 мл 10 % взвеси хирургического талька на физиологической растворе. Данный способ моделирования нашел широкое применение в экспериментальной работе. В частности, С.А. Демкин использовал его для изучения регенеративного эффекта обогащенной тромбоцитами аутоплазмы после моделирования остеоартроза коленного сустава у крыс (2017).

По данным автора, через 1 месяц после моделирования происходило уменьшение толщины суставного хряща до $121,0 \pm 20,4$ мкм ($p < 0,05$) и снижение

объёмной доли хондроцитов до $1,2 \pm 0,6 \%$ ($p < 0,05$). Во всех зонах были отмечены множественные «пустые лакуны» и хондроциты с кариопикнозом, обширные участки деструкции суставной поверхности с разрастанием соединительной ткани, в толще которой определяли гранулематозное воспаление с выраженной гистиомакрофагальной инфильтрацией и гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел. При гистохимическом исследовании в суставном хряще отмечали неравномерность окрашивания коллагеновых волокон с выраженным нарушением тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани.

Опосредованное воздействие на сустав, в том числе с применением физических факторов

Отдельная группа методов моделирования патологий суставной поверхности представляет собой опосредованное воздействие на сустав, в том числе с применением физических факторов. Среди этой группы достаточно много оригинальных способов. Во многих из них фигурирует коррекция диеты у животных с целью формирования у них избыточной массы тела.

Известен способ И.О. Сукманского с соавт., который заключается в том, что лабораторных животных (крыс) содержат три-пять недель на рафинированной диете, обогащенной сахарозой. Производят им однократную подсадку 1 г артрозоченной смеси, содержащей равное количество измельченных аллогенных тканей коленного сустава и полного адьюванта Фрейнда.

Подобный эффект достигается за счет малоподвижного образа жизни животных в тесных клетках и ношения ими оригинальных костюмов с отягощением. Так, в исследовании А.П. Курпякова с соавт. (2009) с целью моделирования остеоартроза тазобедренного сустава овцам надевали на спину жилет с металлическими пластинами, увеличивающими массу тела животного на 1/3.

Известно влияние физических факторов с целью формирования у животных остеоартроза, в частности воздействие на них низких температур (Патент РФ на изобретение № 2205458 от 27.05.2003 г., В.И. Тиханов с соавт.). Способ

заключается в том, что экспериментальных животных (крыс или мышей), находящихся на стандартном рационе питания, ежедневно в течение 30 дней на три часа помещали в климатокамеру, где создавали температурные условия -15°C.

Авторы подтверждали формирование у животных деструктивно-дистрофических процессов в крупных суставах по соотношению содержания коллагена I и II типов и по содержанию углеводного компонента коллагена в хрящевой ткани.

Достаточно оригинальным является способ моделирования остеоартроза, предложенный К.В. Корочиной с соавт. (Патент РФ № 2587039 от 10.06.2016). Способ осуществляли у крыс линии Wistar путем проведения ежедневных подкожных инъекций 1% 0.1 мл раствора мезатона на протяжении 2 недель с последующим плаванием крыс после каждой инъекции в течение 20 минут и помещения животных на 2 месяца в тесные клетки с обеспечением им высококалорийной диеты, включающей не менее 55 % углеводов, не менее 30 % жиров и не менее 9 % белков от рациона питания.

Следует отметить, что патологии суставной поверхности возможно моделировать, не оказывая прямого воздействия на сустав. В этой связи интерес представляет сообщение Dai Guofeng et al., в котором предложен метод формирования остеоартроза у морских свинок посредством выполнения двусторонней овариэктомии. В любом случае опосредованные модели деструктивно-дистрофических процессов в суставах нередко обладают общими недостатками – длительностью развития заболевания, нежелательными эффектами для других систем организма животного.

Механические повреждения анатомических структур

Предложено большое количество хирургических способов моделирования патологий суставной поверхности. Поскольку механическая нагрузка имеет существенное значение в патогенезе этого деструктивно-дистрофического заболевания, то среди экспериментальных моделей в целом преобладают модели остеоартроза травматического генеза (Таблица 2).

Таблица 2. - Моделирование деструктивно-дистрофических заболеваний суставов у животных путем повреждения анатомических структур

Вид животного	Повреждаемая структура	Авторы модели
Собаки	Пересечение передней крестообразной связки унилатерально, билатерально	Marshall J.L et al., 1971; Brandt K.D., 1994; Marshall K.W., Chan A.D., 1996
Кролики	Пересечение передней крестообразной связки	Christensen S.B., 1983 Vignon E. et al., 1991
Овцы	Менискэктомия	Ghosh P. Et al., 1993
Кролики	Менискэктомия	FamA.G. et al., 1995; Moskowitz R.W., Goldberg V.M., 1987
Морские свинки	Менискэктомия	Bendele A.M., 1987
Морские свинки	Миоэктомия	Arsever C.L, Bole G.G., 1986; LaytonM.W. et al., 1987; Dedrick D.K. et al., 1991
Кролики	Контузия надколенника	OegemaT.R.J, etal., 1993 MazieresB. etal., 1990
Собаки	Денервация с последующим пересечением передней крестообразной связки	VilenskyJA etal., 1994

Так, одним из наиболее радикальных можно считать способ формирования экспериментального остеоартроза коленного сустава путем удаления латерального мыщелка бедра у кроликов. Достаточно много методик по формированию остеоартроза коленного сустава, связанных с пересечением передней крестообразной связки — эту методику применяют у собак, кроликов, крыс.

Помимо передней крестообразной связки могут повреждаться и другие элементы сустава - медиальный мениск, медиальная коллатеральная связка в

разных комбинациях. Несмотря на сроки создания, эти модели до сих пор широко используют при выполнении научных исследований

Современные модели патологий суставной поверхности связанные с повреждением анатомических структур, стремятся минимизировать травматичность вмешательства. Однако в ряде случаев хирургические модели остаются достаточно сложными для исполнения. Так, в патенте РФ на изобретение № 2676653 от 9.01.2019 «Способ создания модели остеоартроза коленного сустава кролика травматического генеза» М.В. Гилева, С.М. Кутепова, Е.А. Волокитиной с соавторами представлена следующая оригинальная методика.

В асептических условиях у наркотизированного животного с медиальной поверхности коленного сустава послойно после прямого кожного разреза выделяют и пересекают сухожилие *pes anserinus superficialis* на уровне границы дистальной и средней ее трети. Затем в области медиального мыщелка производят субпериостальную диссекцию.

Проводят подменисковую артротомию. Долотом выбивают участок кости размером 1×1×0,5 см с выходом на суставную поверхность. На середине длины данного участка проводят поперечную остеотомию, после чего выполненный участок кости делят на проксимальный и дистальный сегменты. Дистальный сегмент удаляют. Проксимальный сегмент импактируют в дистальном направлении. После чего рану послойно ушивают, не захватывая в шов сухожилие «гусиной лапки», тем самым дестабилизируя сустав. Животных выводят из опыта через 45 суток.

По данным авторов, на момент вывода из эксперимента опороспособность тазовых конечностей у кроликов сохранялась. Клинически в течение первых 7 суток наблюдали разгибательную контрактуру в коленных суставах.

Особняком стоят способы моделирования остеоартроза, связанные с хирургией сосудов. Так, известен способ (Патент РФ на изобретение № 2452999 от 10.06.2012 авторов Макушина В.Д., Степанова М.А., Ступиной Т.А.), заключающийся в пересечении бедренной артерии.

У наркотизированных животных (собак), после обработки операционного поля, с медиальной поверхности бедра через прямолинейный разрез мягких тканей выделяют бедренную артерию на уровне средней части бедренной кости, лигируют ее на двух уровнях и пересекают между лигатурами. После этого коленный сустав собаки иммобилизуют аппаратом Г.А. Илизарова, состоящим из двух дугообразных опор, соединенных шарнирными узлами с резьбовыми хвостовиками. Одну из опор располагают в нижней трети бедра, другую в верхней трети голени. В качестве костных фиксаторов используют спицы Киршнера, по три на каждой опоре. После операции все животные получают анальгетики и антибиотики широкого спектра действия (анальгин внутримышечно по 1 мл 2 раза в день в течение трех дней, цефазолин внутримышечно по 0,5 мл 2 раза в день в течение пяти дней).

Период иммобилизации у этих животных составляет от 28 до 40 суток. По данным авторов, в течение первых 3-5 суток после резекции бедренной артерии и иммобилизации коленных суставов у собак наблюдали субфебрильную общую температуру в пределах 39-39,5°C, отек на конечностях был небольшой и локализовался в основном в области бедра. Местная температура повышалась незначительно и сохранялась в течение 7-14 суток после оперативного вмешательства.

На момент снятия аппарата (28 суток иммобилизации) опороспособность тазовых конечностей у собак сохранялась, они передвигались самостоятельно, но походка их была скованной. Клинически у животных наблюдали разгибательные контрактуры коленных суставов. Угол пассивного сгибания составлял 45°. Через 14 суток после снятия аппарата у всех животных контрактуры исчезали.

Недостатком модели является высокий риск развития гангрены задней конечности кролика. Условия иммобилизации коленного сустава аппаратом внешней фиксации не вполне соответствуют биомеханическим условиям развития остеоартроза травматического генеза. Имеется техническая сложность монтажа и демонтажа аппарата внешней фиксации у собак.

Более щадящим методом является нанесение дефектов различной степени тяжести на суставную поверхность и повреждение связочного аппарата. Например, известен способ моделирования посттравматического артроза тазобедренного сустава у крыс посредством нанесения стандартного дефекта в виде круглого отверстия диаметром 2 мм, проникающего через суставной хрящ в субхондральную кость. В работе Marijnissen A. C. et al. для моделирования остеоартроза у собак в нагружаемой области мыщелка бедра наносили дефект в виде борозды без повреждения субхондральной кости.

Самарскими учеными также предложен способ моделирования остеоартроза травматического генеза (Г.П. Котельников, Ю.В. Ларцев, Д.А.Долгушкин, 2010). В рамках изучения регенеративных свойств новых материалов для хондропластики у кроликов выполняли моделирование травматических дефектов суставной поверхности. По медиальной поверхности коленного сустава проводили дугообразный разрез, который позволял беспрепятственно вывихнуть надколенник.

Создавали костно-хрящевые дефекты надколенниковой поверхности бедренной кости одной или обеих задних конечностей. С помощью зубоврачебного бора при малых оборотах, орошая сверло физиологическим раствором, формировали костно-хрящевые дефекты диаметром до 2 мм, глубиной - до 3 мм. В контрольной группе животных, которым не выполняли пластику дефектов суставной поверхности, в динамике наблюдали развитие в коленном суставе деструктивно-дистрофических процессов.

В динамике отмечали изменение характеристик суставной поверхности – снижение прозрачности хряща, его цвета, появление множественных узур, участков разволокнения. В ряде случаев наблюдали появление в суставе жировых тел, развитие синовита. Микроскопическая картина также свидетельствовала о появлении признаков деструктивно-дистрофического процесса в суставном гиалиновом хряще, который был истончен, имел нечётко выраженную зональность строения. Отмечали большое количество

дистрофически измененных хондроцитов разной формы, пустые лакуны. Большинство клеток содержали пикнотические ядра

В целом, моделирование патологий суставной поверхности путем повреждения анатомических структур требует тщательного планирования эксперимента с учетом дальнейшей цели исследования. Так как помимо травматичности выполнения данные способы нередко приводят к длительному нарушению функции сустава животного, его инвалидизации и даже летальному исходу.

Модели спонтанных деструктивно-дистрофических заболеваний суставов

Отдельное место занимают модели спонтанных патологий суставной поверхности, разработанные для различных животных: морских свинок, собак, сирийских хомяков, мышей. На сегодняшний день достаточно популярны исследования, касающиеся использования генетически модифицированных трансгенных мышей, у которых наступает преждевременная деструкция хряща.

Так, известна модель спонтанного остеоартроза у мышей линии STR/OPT (R.M. Mason et al., 2011). У всех животных в возрасте 32-35 недель развивается преждевременная деструкция суставного гиалинового хряща, наиболее выраженная в области медиального плато большеберцовой кости. Для получения линии STR/OPT требуются мыши линии STR/1N, близкородственное скрещивание которых при определенных условиях после периода нон-инбридинга обеспечивает рождение животных с необходимыми генетическими и фенотипическими признаками. Также важными недостатками модели являются длительный период формирования остеоартроза (в среднем, около 6 месяцев), индивидуальная вариабельность поражения тканей сустава.

Исследования A.M. Bendele, J.E Hulman , а также S.C.R. Meacock и соавторов (2000) показали, что к 13 месяцу жизни у всех самцов морских свинок линии Dunkin Hurlley появляется деструкция суставного хряща. Аналогичные изменения у самок появляются позже и носят более мягкий характер. В возрасте 1 года наблюдают полную потерю суставного хряща в области медиального мыщелка

бедренной кости и пластинки большеберцовой кости. Увеличение массы тела морских свинок линии Dunkin Hurlley усугубляет течение болезни.

Безусловно, модели спонтанных патологий суставной поверхности у разных животных с известными сроками и особенностями развития представляют интерес для выполнения научных исследований. Однако в ряде случаев получение этих линий животных для доклинических исследований сопряжено с экономическими трудностями.

Таким образом, не существует универсальной модели патологии суставной поверхности. Каждая из них часто учитывает один или несколько факторов этиологии и патогенеза данных заболеваний. Поэтому, планируя научное исследование, необходимо четко понимать с какой целью осуществляется моделирование патологий суставной поверхности, какие сроки формирования повреждений или деструктивно-дистрофических процессов в суставе будут оптимальными, с какими осложнениями при этом можно столкнуться и как их избежать.

Таким образом, доклинические исследования изучения эффективности ОТП для пластики дефектов суставной поверхности предполагают создание в эксперименте у животных моделей патологических процессов, в частности, повреждений и деструктивно-дистрофических процессов в суставах. Подобные модели известны, однако существуют определенные сложности – получение достаточного объема ОТП, трудность прижизненной оценки эффективности восстановления суставной поверхности. Разработка новых, совершенствование известных методов инструментальной диагностики у животных способно решить эту проблему.

Использование в эксперименте у животных модели повреждения суставной поверхности коленного сустава, с дальнейшим комплексным изучением клинических, инструментальных и морфологических данных после пластики дефектов ОТП позволило бы расширить представление о

предполагаемых механизмах её действия и возможности комбинированной пластики дефектов ОТП совместно с другими биоматериалами.

В дальнейшем полученные в эксперименте данные возможно будет использовать для совершенствования способов способа получения ОТП в клинике, улучшения приёмов инструментальной диагностики качества формирующихся реенератов и зон пластики в целом.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн доклинического исследования

Для обоснования эффективности применения новой медицинской технологии, способов диагностики, оперативного лечения необходимо выполнение их доклинической апробации, в частности в экспериментах у животных. В рамках данной работы на базе Института экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета нами было выполнено экспериментальное исследование.

С целью изучения эффективности применения обогащенной тромбоцитами аутоплазмы для хондропластики костно-хрящевых дефектов суставов, а также выполнения сравнения качества новообразованных регенератов, формирующихся при других видах пластики дефектов проведено доклиническое исследование на 53 разнополых кролика породы «Шиншилла» массой 2,5-3кг, возрастом 6-7 месяцев. Кролики неоднократно использовались в качестве моделей для изучения посттравматических и деструктивных заболеваний опорно-двигательной системы как отечественными, так и зарубежными учеными.

В частности, в самарской школе травматологов-ортопедов путем выполнения экспериментов на кроликах были обоснованы новые операции в области сухожильно-мышечной пластики, доказана эффективность применения гипербарооксигенотерапии, гравитационной терапии в лечении деструктивно-дистрофических заболеваний (Г.П. Котельников, И.И. Лосев, Ю.В. Ларцев и другие, 2004). Впервые была оценена возможность применения клеточных технологий – аутологичной и аллогенной трансплантации хондроцитов на биологическом носителе для выполнения хондропластики (Д.А. Долгушкин, М.А. Тертерян, 2011).

Данная работа была одобрена локальным биоэтическим комитетом (протокол № 195 от 10.10.2018). Эксперименты проводили в рамках современных российских и международных рекомендаций по выполнению медико-биологических исследований с использованием животных.

У 7 здоровых животных этого же возраста, содержащихся в сходных условиях это же время перед началом основного эксперимента были определены границы нормы изучаемых признаков. В частности были изучены анатомические, функциональные характеристики коленных суставов задних конечностей, в том числе локальные термометрические показатели.

Животным были выполнены диагностические исследования – рентгенография коленных суставов в двух проекциях, компьютерная томография суставов. После выведения здоровых кроликов из эксперимента были изучены особенности макроскопической картины надколенниковой поверхности бедренной кости, характеристики интактного гиалинового хряща данной зоны, оценено состояние анатомических структур коленных суставов в целом.

Были проведены исследования интактных суставных поверхностей с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния, выполнено морфологическое исследование зоны формирования костно-хрящевых дефектов с оценкой микроскопической картины зон интереса.

Дизайн исследования выглядел следующим образом. Всем 53 животным формировали два полнослойных костно-хрящевых дефекта надколенниковой поверхности бедренной кости, после чего выполняли заполнение сформированных дефектов пластическим материалом. Некоторым животным выполняли операции на обеих задних конечностях – в таком случае интервал между оперативными вмешательствами составлял один месяц, вид пластического материала у таких животных был одинаковым. Кролики были разделены на три группы сравнения.

Первую группу (I) сформировали 18 животных (22 сустава), которым выполняли пластику дефектов деминерализованным костным материалом - спонгиозой, полученным из головок кроличьих бедренных костей по методике «Лиопласт» ®.

Вторую группу (II) составили 17 кроликов (22 сустава), костно-хрящевые дефекты которых заполняли аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой, изготавливаемой параллельно с выполняемой операцией.

Третью группу (III) сформировали 17 животных (22 сустава), которым выполняли комбинированную пластику вышеуказанным костным материалом и аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой.

Подробно особенности получения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов и выполнение оперативных вмешательств изложены в Главе 3. В послеоперационном периоде содержание и медикаментозная поддержка животных в группах сравнения не отличались. В динамике до и после оперативного вмешательства выполняли осмотр, обработку ран в раннем послеоперационном периоде, оценку функции задних конечностей.

После седации осуществляли диагностические исследования – рентгенографию и компьютерную томографию коленного сустава. Данные исследования выполняли на сроках 2 недели, 1 месяц и 3 месяца после операции. На этих же сроках в соответствии с планом работы выводили животных из эксперимента путем введения им летальной дозы комбинации растворов золетила и рометара. Проводили макроскопическое изучение областей пластики, применяли спектроскопию комбинационного рассеяния, осуществляли морфологическое исследование.

Комплекс примененных клинических, инструментальных, морфологических методов исследований позволил объективно оценить эффективность рассматриваемых способов пластики костно-хрящевых дефектов с использованием аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы.

2.2. Методы исследования

Осмотр животных

С целью объективизации результатов осмотра нами был применен способ оценки анатомического и функционального состояния задних конечностей у кроликов в эксперименте (удостоверение на рационализаторское предложение № 132 от 2.03.11, автор Д.А. Долгушкин) – Таблица 3.

Выраженность симптомов оценивали по трехбалльной шкале: 3 балла - функция не нарушена; 2 балла - частичное отклонение показателей от нормы; 1 балл – полное нарушение функции, значительно выраженные патологические изменения.

Таблица 3 - Способ оценки функционального состояния задней конечности кролика (Д.А. Долгушкин, 2011).

Характеристика	Степень выраженности	Оценка
1. Опороспособность задней конечности	полная	3 балла
	частичная	2 балла
	отсутствует	1 балл
2. Болезненность при пальпации коленного сустава	отсутствует	3 балла
	незначительная	2 балла
	значительная (двигательная и голосовая реакция)	1 балл
3. Отек мягких тканей коленного сустава	отсутствует	3 балла
	периодический	2 балла
	постоянный	1 балл
4. Окружность коленного сустава в с/3	5-7 см	3 балла
	8-10 см	2 балла
	11-13 см	1 балл
5. Местное повышение температуры	не определяется	3 балла
	определяется при термометрии	2 балла
	определяется пальпаторно	1 балл
6. Ограничение объема движений в коленном суставе	отсутствует	3 балла
	ограничено до 50% от нормы	2 балла
	ограничено свыше 50% от нормы	1 балл
7. Гипотрофия мышц	отсутствует	3 балла
	разница окружности на симметричных участках конечностей до 2 см	2 балла
	разница более 2 см	1 балл
8. Состояние послеоперационной раны	Рана сухая, швы состоятельны, воспаления нет	3 балла
	Рана сухая, швы состоятельны, имеются признаки воспаления раны	2 балла
	Швы несостоятельны, отделяемое из раны	1 балл

Опороспособность задней конечности кролика оценивали как в клетке, так и по извлечению животного из нее и перемещению в вольере. Для измерений

окружности сегментов конечности и сустава применяли сантиметровую ленту. При измерении объема движений в суставе использовали угломер. В раннем послеоперационном периоде оценку состояния раны выполняли до её обработки, отмечая наличие или отсутствие признаков воспаления, состоятельность швов, выделения из раны. После этого выполняли необходимую хирургическую обработку и продолжали оценку состояния коленного сустава животного.

Термографическое исследование

Инструментальное исследование кроликам выполняли на портативном компьютерном термографе ИРТИС 2000 М (Россия). Аппарат позволяет визуализировать и регистрировать инфракрасное излучение от поверхности тела животного с температурным разрешением до 0.01°C (Рисунок 1).

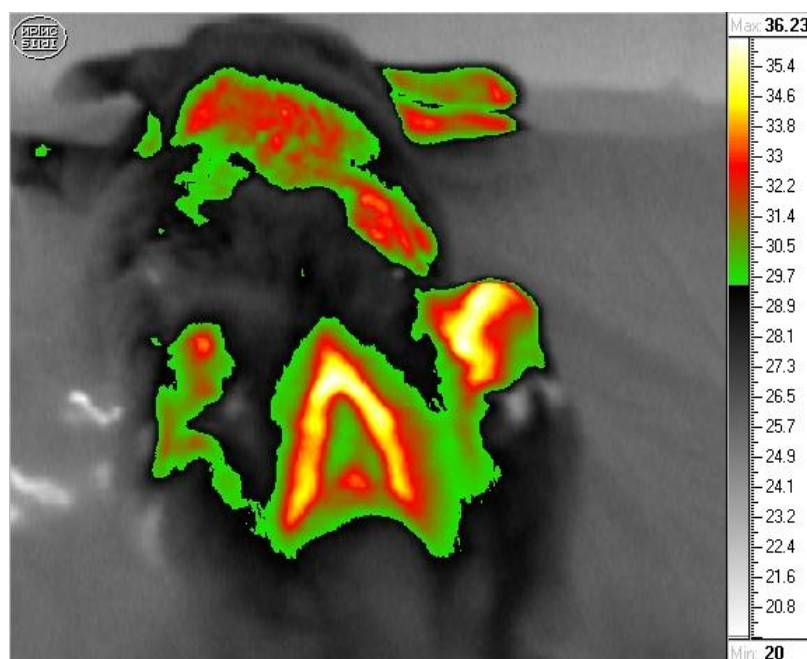


Рисунок 1 –Термограмма коленных суставов кролика на 5 день после выполнения хондропластики дефектов левого коленного сустава деминерализованным костным материалом - определяется термоасимметрия вследствие реакции местных тканей на оперативное вмешательство.

Данное исследование было наиболее актуально в раннем послеоперационном периоде для выявления длительности реактивной реакции и скорости ее купирования при различных видах пластики дефектов суставной поверхности.

Рентгенография

Рентгенографию в прямой и боковой проекции животным выполняли после предварительной седации на аппарате PHILIPS med 10 50 ср (Германия). В динамике выявляли появляющиеся рентгенологические признаки деструктивно-дистрофических изменений суставов животных. Оценку проводили по пятибалльной шкале (С.П.Миронов с соавторами, 1999). Определяли сужение суставной щели: при его отсутствии присваивали 5 баллов; при сужении до половины нормальной ширины -4 балла; более половины ширины -3 балла. При прослеживании суставной щели в виде нити оценивали данный признак в 2 балла. Если щель прослеживалась не везде в 1 балл; не визуализировалась вообще – в 0 баллов.

Анализировали состояние мыщелков. В случае отсутствия их поражения присваивали 5 баллов. При склерозе замыкательной пластинки 4 балла. При обнаружении выраженного склероза замыкательных пластинок и незначительного остеопороза -3 балла. При выраженном склерозе и остеопорозе мыщелков оценивали данный признак в 2 балла. При наличии кист оценку снижали до 1 балла, при деструкции кости до 0 баллов.

Оценивали деформацию коленного сустава. При её отсутствии присваивали 5 баллов. При наличии небольших единичных остеофитов - 4 балла; крупных множественных – 3 балла. Выявление краевых разрушений мыщелков оценивали в 2 балла; их деформационное уплощение в 1 балл; значительные разрушения кости с нарушением оси конечности оценивали в 0 баллов.

Компьютерная томография

Компьютерную томографию (КТ) коленных суставов животного выполняли на аппарате Toshiba Aquilion 32 (Япония). Нами разработан новый способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики у кроликов (Патент РФ на изобретение № 2727002 от 17.07.2020), который будет подробно описан в Главе 3.

В динамике животным выполняли КТ коленных суставов задних конечностей, получая тонкие срезы до 0,5 мм с перекрытием с получением двух серий изображений с высоким и низким керенелом для оценки костных и мягкотканых структур. Осуществляли построение 3D модели области коленного сустава. Проводили виртуальную резекцию надколенника в режиме Volume rendering, получая обзор суставной надколенниковой поверхности бедренной кости (Рисунок 2).

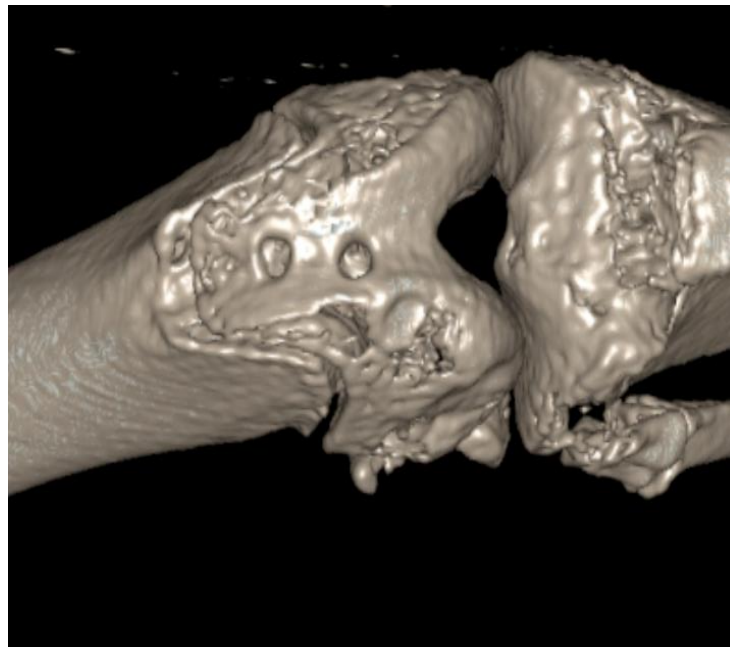


Рисунок 2 - 3D модель коленного сустава кролика с виртуальной резекцией надколенника в режиме Volume rendering – визуализируются два дефекта надколенниковой поверхности бедренной кости, частично заполненные пластическим материалом.

В костном окне переформатировали стандартные плоскости, получая косокорональную и косоаксиальную плоскости таким образом, чтобы каналы заполненных регенератами дефектов располагались параллельно косоаксиальной и перпендикулярно косокорональной плоскостям. В косоаксиальной плоскости анализировали уровень заполнения дефектов регенератами и их качество. Подсчитывали среднюю плотность новообразованной ткани в единицах Хаунсфилда на разных уровнях зоны дефектов и в целом.

Макроскопическое исследование

Помимо инструментальной оценки восполнения регенератами области дефектов с помощью компьютерной томографии, выполняли непосредственную аутопсию комплекса тканей коленного сустава при выводе животных из эксперимента. Макроскопическую осуществляли по балльной шкале, предложенной S. O' Driscoll et al. (1986) (Таблица 4).
Таблица 4 - Шкала макроскопической оценки коленного сустава S. O' Driscoll et al. (1986)

Критерии	Степень выраженности	Оценка
1. Амплитуда движений в суставе	ограничения нет	2 балла
	ограничение менее 50% от нормы	1 балл
	ограничение более 50% от нормы	0 баллов
2. Восстановление контура суставной поверхности	полное	2 балла
	частичное	1 балл
	отсутствует	0 баллов
3. Внутрисуставной спаечный процесс	отсутствует или единичные спайки	2 балла
	умеренный	1 балл
	выраженный	0 баллов
4.Эрозии суставной поверхности	отсутствуют	2 балла
	только в области трансплантатов	1 балл
	в области трансплантатов и окружающего хряща	0 баллов
5. Внешний вид регенерата	не отличается от окружающего хряща	2 балла
	похож, но различим с окружающим хрящом	1 балл
	различия сильно заметны	0 баллов

Документировали макроскопическую картину с помощью цифровой камеры «CANON EOS 4000D KIT kit» (Canon, Япония).

При оценке области хондропластики учитывали такие показатели как восстановление формы суставной поверхности, степень восполнения дефектов суставного гиалинового хряща, размеры, цвет, однородность регенерата, сращение его с окружающим гиалиновым хрящом. Отмечали также сравнительную плотность регенерата при ощупывании тупым инструментом, прочность соединения его с подлежащей субхондральной костью, наличие дегенеративных изменений новообразованной ткани, окружающего и противолежащего суставного гиалинового хряща.

Кроме оценки состояния суставных концов костей определяли (если имело место) реакцию воспаления синовиальной оболочки, образование ограничивающих подвижность в суставе рубцовых спаек. Учитывали амплитуду движений в суставе, восстановление контура суставной поверхности, выраженность внутрисуставного спаечного процесса, наличие эрозий. Особое внимание уделяли внешнему виду регенерата.

Рамановская спектроскопия комбинационного рассеяния

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР) для исследования спектральных характеристик суставных поверхностей реализовывали на базе кафедры лазерных и биотехнических систем Самарского национального исследовательского университета им. С.П. Королева под руководством к. ф-м. н, доцентов Тимченко Е.В. и Тимченко П.С.).

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния реализовывали с помощью экспериментального стенда (Рисунок 3).

Рамановский пробник 2 фокусировал лазерное излучение на объекте 1 (диаметр пятна 0.2 мм на расстоянии 7.5 мм от выходного окна тубуса) и собирал рассеянное объектом излучение и фокусировал отфильтрованное в спектральном диапазоне 790-1200 нм излучение на входной торце приёмного оптоволокну, по которому транспортировался до входной щели спектрометра Shamrock sr-303i 3

со встроенной охлаждаемой камерой 4. Для уменьшения уровня шумов, матрицу камеры 4 охлаждали до температуры -60°C , обеспечивая спектральное разрешение 0.15 нм ($\sim 1\text{ см}^{-1}$).

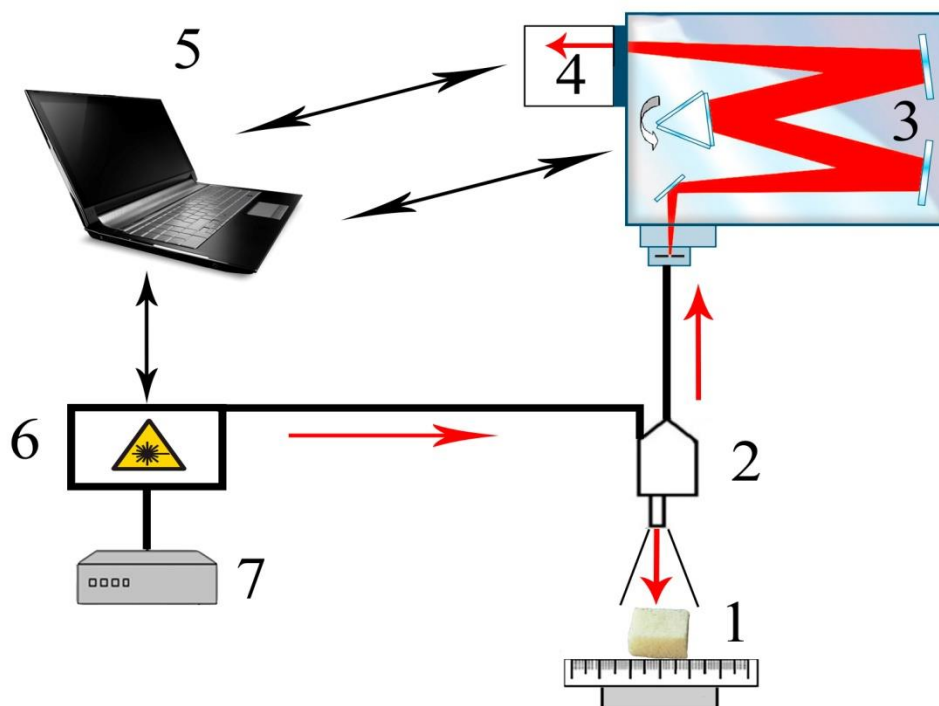


Рисунок 3 – Экспериментальный стенд: 1 – исследуемый объект; 2 – рамановский пробник RPB785; 3 – спектрометр Shamrock sr-303i; 4 – встроенная охлаждаемая камера DV420A-OE; 5 – компьютер; 6 – лазерный модуль LuxxMaster LML-785.0RB-04; 7 – источник питания лазерного модуля.

Погрешность метода не превышала 4%. Обработку спектров проводили в программной среде Wolfram Mathematica 10. Она заключалась в удалении шумов сглаживающим медианным фильтром. Затем на выбранном интервале при помощи итерационного алгоритма определяли аппроксимирующую линию (полином пятой степени) автофлуоресцентной составляющей и затем вычитали эту составляющую, получая выделенный спектр КР.

Осуществляли анализ спектральных характеристик поверхности интактного суставного гиалинового хряща и поверхности регенерата области пластики. При

этом спектральные характеристики снимали с разных зон регенерата – в центре, на периферии, на границе с интактным хрящом.

Помимо основного доклинического экспериментального исследования на животных и оценки спектральных характеристик поверхности регенератов, с помощью метода СКР нами было выполнено исследование интраоперационного материала, полученного при операциях эндопротезирования коленных суставов у людей. Была дана сравнительная характеристика спектрального портрета суставной поверхности, пораженной деструктивно-дистрофическим процессом и интактного суставного гиалинового хряща человека.

Морфологическое исследование

После макроскопического исследования выполняли резекцию суставного конца бедренной кости, резецировали надколенник и комплекс мягкотканых структур. Одним из основных моментов подготовки образцов являлась декальцинация, которую проводили трилоном Б. После препараты отмывали в 96° спирте в течение 3 - 4 дней при его ежедневной смене. Заливали препараты парафином. Изготавливали серийные срезы толщиной 5 - 8 микрон. Препараты окрашивали гематоксилином-эозином, а также крезилковым фиолетовым, специфичным для суставной гиалиновой хрящевой ткани.

Для оценки качества новообразованных регенератов, их всесторонней оценки на разных уровнях заполнения дефекта применяли морфологическую шкалу оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща, предложенную Д.А. Маланиным с соавторами (2004) (Таблица. 5).

Данная шкала позволяла оценить не только степень заполнения дефекта, но и проанализировать клеточный состав зон регенерата, выявить наличие патологических структур в нём не свойственных типичному суставному гиалиновому хрящу, проследить характер регенерации субхондральной кости, оценить окрашивание матрикса новообразованной ткани регенерата. В целом цифровой анализ микропрепаратов позволял более объективно судить о характере

регенерации тканей при замещении дефектов разными пластическими материалами.

Таблица 5 - Морфологическая шкала оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавт. (2004)

Критерии	Степень выраженности	Баллы
1. Клеточный состав ткани в области дефекта	Соответствует нормальному ГХ	20
	Более 50% клеток имеют строение хондроцитов	15
	Менее 50% клеток имеют строение хондроцитов, а большинство - фибробластов	10
	Встречается единичное число хондроцитов	5
	Значительное количество бесклеточных зон	0
2. Степень заполнения дефекта	90-110%	20
	75-89% или 111-125%	15
	50-74% или 126-150%	10
	25-49% или более 150%	5
	менее 25%	0
3. Структура поверхностных слоев дефекта	соответствует нормальному ГХ	10
	Имеется небольшое разволокнение	6
	Разволокнение средней степени и беспорядочное расположение волокон	2
	Значительное разволокнение, непрерывность поверхности нарушена	0
4. Структура глубоких слоев дефекта	соответствует нормальному ГХ	10
	небольшое разволокнение, маленькие полости, расположение клеток столбиками	6
	Разволокнение средней степени, большие и малые полости, редкие столбики клеток	2
	Значительное разволокнение, образование	0

	многочисленных полостей	
5. Окрашивание матрикса	соответствует нормальному ГХ	5
	Интенсивность снижена незначительно	4
	Интенсивность снижена значительно	2
	Не окрашивается	0
6. Сращивание регенерата с окружающим ГХ	Полное сращивание и переход одной ткани в другую по всей глубине края дефекта	15
	Перерыв или неполное сращивание на границе между тканями менее, чем на $\frac{1}{2}$ глубины края дефекта	10
	Перерыв или неполное сращивание на границе между тканями более, чем на $\frac{1}{2}$ глубины края дефекта	5
	Несращение между тканями по всей глубине края дефекта	0
7. Степень восстановления субхондрального слоя кости в области дефекта	90-100%	20
	75-89%	15
	50-74%	10
	25-49%	5
	Менее 25%	0
Сумма баллов		

Микрофотографии с гистологических препаратов осуществляли с помощью автоматизированной аналитической системы, включающей микроскоп «Olympus CX 21», цифровую фотокамеру «Olympus» С – 4000 ZOOM (Япония) и системный блок на базе процессора Intel Pentium 4.

Таким образом, комплекс примененных клинических, инструментальных, морфологических методов исследования позволил объективно оценить эффективность рассматриваемых способов пластики костно-хрящевых дефектов с

использованием аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы и деминерализованного костного биоматериала.

Статистическую обработку полученного массива данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics (IBM, США, лицензия №5725-A54) с последующей оценкой результатов на основе позиций доказательной медицины (Г.П. Котельников, А.С. Шпигель, 2012).

ГЛАВА 3. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫПОЛНЕНИЮ ХОНДРОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ И К ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПЕРАЦИИ

Получение обогащенной тромбоцитами плазмы у людей достаточно хорошо разработано. Существует ряд методик, включающих общие этапы забора цельной крови, её последовательного центрифугирования, фракционирования. Ряд отличий связан с использованием разных ёмкостей, переходников, физическими особенностями их внутренних поверхностей, контактирующим с биоматериалом, содержимым, режимами центрифугирования, чистотой забора конечного продукта и его характеристиками.

Однако не так много литературных данных предлагают описание возможностей получения обогащенной тромбоцитами плазмы у животных. Тем не менее, для выполнения успешных доклинических исследований эффективности данного продукта это становится необходимым. В данной главе рассмотрена модифицированная нами методика получения обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов, особенности ее применения при выполнении хондропластики.

Особенностью выполнения доклинических исследований у животных является также особый подход к динамической оценке изучаемого процесса. Для оценки эффективности хондропластики в настоящее время применяют компьютерную томографию (КТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ), в том числе с T2-картированием суставного хряща.

Безусловно, выполнение МРТ в рамках доклинического исследования является достаточно дорогой процедурой. Не создано специальных программ для оценки области хондропластики с помощью КТ. В этой главе представлен оригинальный новый способ оценки результатов компьютерной томографии области хондропластики с целью неинвазивной оценки качества новообразованных регенератов с помощью рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния.

Метод рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния является достаточно новым физическим методом для доклинических исследований, да и

клинических работ в целом. Его возможности позволяют оценить спектральный портрет поверхностей биологических субстратов. Зная качественные и количественные спектральные характеристики той или иной поверхности в норме, можно диагностировать её патологические изменения. В свою очередь, изучив значимые спектральные показатели разных патологических процессов, можно выявлять их с помощью данного метода, не выполняя трудозатратные и долговременные морфологические исследования.

В данной главе проанализированы результаты и возможности применения метода рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки качества суставной поверхности костей, резецированных при эндопротезировании коленного сустава у человека и суставной поверхности костей после выполнения хондропластики в экспериментальном исследовании у животных.

3.1. Методика получения и применения для хондропластики обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов

Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов нами был модифицирован известный способ получения данного продукта. Процедура была регламентирована Стандартом операционной процедуры «СОП ИЭМБ-МОРФ 11» от 2.06.2017 года, составленным ведущим научным сотрудником ИЭМБ СамГМУ к.м.н., Н.Н. Сарбаевой.

Этапы получения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы кролика представлены на Рисунке 4. Выполняли забор крови из ушной вены. Охлаждали ее в холодильнике до 18°C. Центрифугировали в течение 8 минут на центрифуге с плавной регулировкой частоты вращения при 250g. Отбирали плазму в пробирку «Эппендорф». Повторно центрифугировали в течение 10 минут при 700g. Собирали плазму в стерильную пробирку, ресуспендировали тромбоциты в 150 мкл плазмы. Переливали 150 мкл плазмы во вторую чистую пробирку. Добавляли в обе пробирки по 6,6 мкл хлорида кальция. Собирали содержимое рабочей пробирки в инсулиновый шприц без иглы, оставляли на 3-4 минуты.

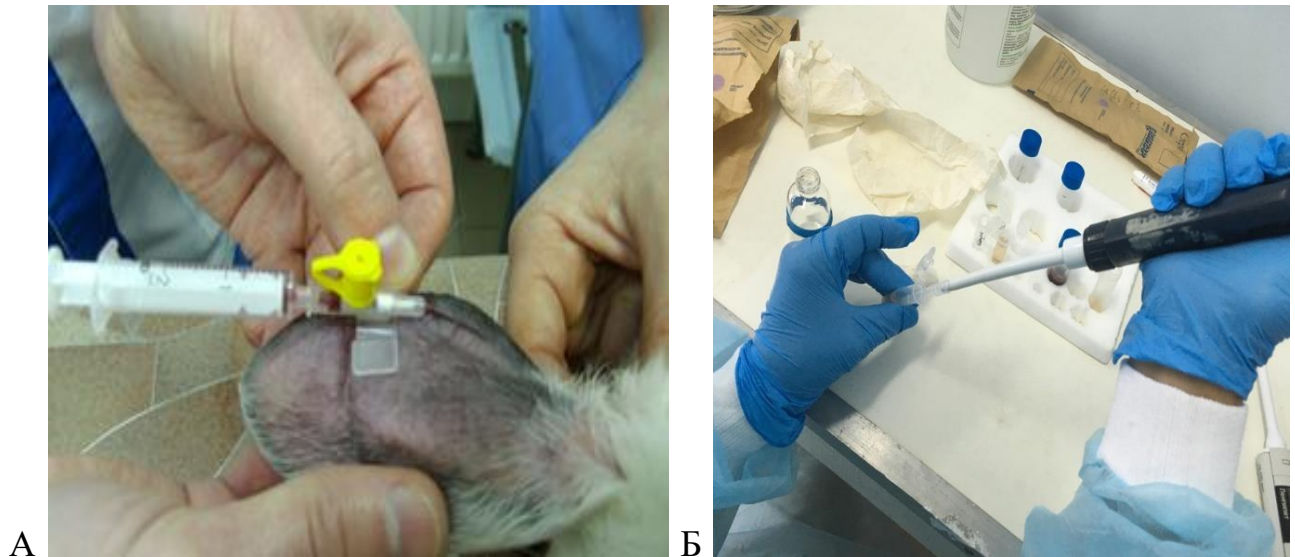


Рисунок 4 – Этапы получения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы у кролика. А – забор крови из вены уха. Б – отбор фракции в пробирку «Эппендорф».

Наблюдали за содержимым чистой пробирки. Как только в ней начинался процесс полимеризации, отдавали рабочий шприц хирургу-экспериментатору для выполнения хондропластики.

Саму операцию осуществляли следующим образом. Выполняли малотравматичный доступ, позволявший беспрепятственно вывихнуть надколенник у наркотизированного животного (Рисунок 5). Далее с помощью зубо-врачебного бора на суставной надколенниковой поверхности бедренной кости создавали два полнослойных остеохондральных дефекта диаметром 2 мм и глубиной до 5 мм.

Перемещение ОТП из шприца выполняли медленно, разместив его кончик вплотную к суставной поверхности, окружающей дефект. Необходимо отметить, что ОТП, полученная в соответствии со Стандартом операционной процедуры «СОПом ИЭМБ-МО РФ 11» от 2.06.2017 года представляла собой вязкий желеобразный субстрат, который проявлял выраженную адгезию к материнскому ложу дефекта.

Интраоперационно после устранения вывиха надколенника, осуществляли пассивные движения в коленном суставе кролика, повторно вывихивали

надколенник – смещения ОТП из дефекта не было. Заполняли дефект суставной поверхности ОТП до уровня интактного суставного хряща (Рисунок 6).

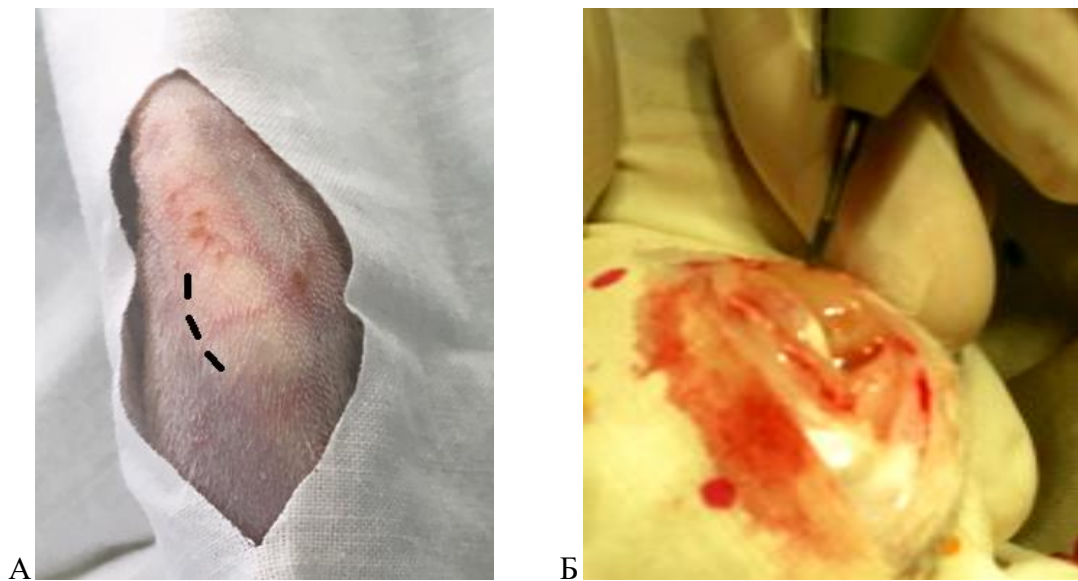


Рисунок 5 – Этапы моделирования полнослойных дефектов суставной поверхности. А – схема доступа для выполнения артротомии; Б – создание дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости с помощью зубо-врачебного бора.

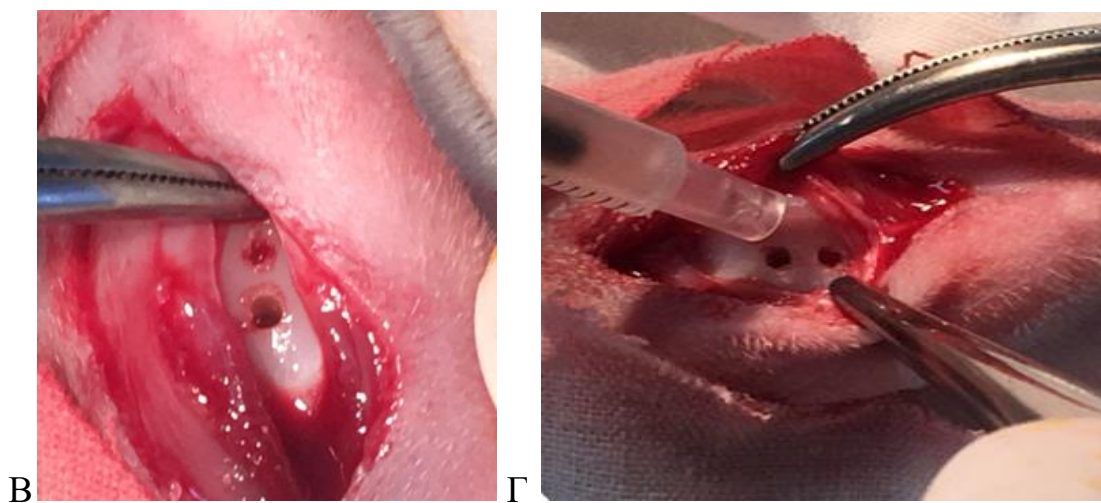


Рисунок 6 – Этапы хондропластики дефектов суставной поверхности ОТП.

А – сформированные полнослойные дефекты суставной надколенниковой поверхности бедренной кости. Б – шприц с ОТП перед заполнением дефектов.

Перед ушиванием наглухо полости коленного сустава в нее вводили оставшуюся фракцию, обедненную тромбоцитами.

В первой группе сравнения у животных для пластики дефектов применяли аллогенную деминерализованную лиофилизированную спонгиозу, изготовленную из головок бедренных костей кроликов по методике «Леопласт»® Самарского банка тканей. Толщина ее тонковолокнистых пластинок достигает 60-70 нм, а расстояние между ними до 100 нм. (Рисунок 7).

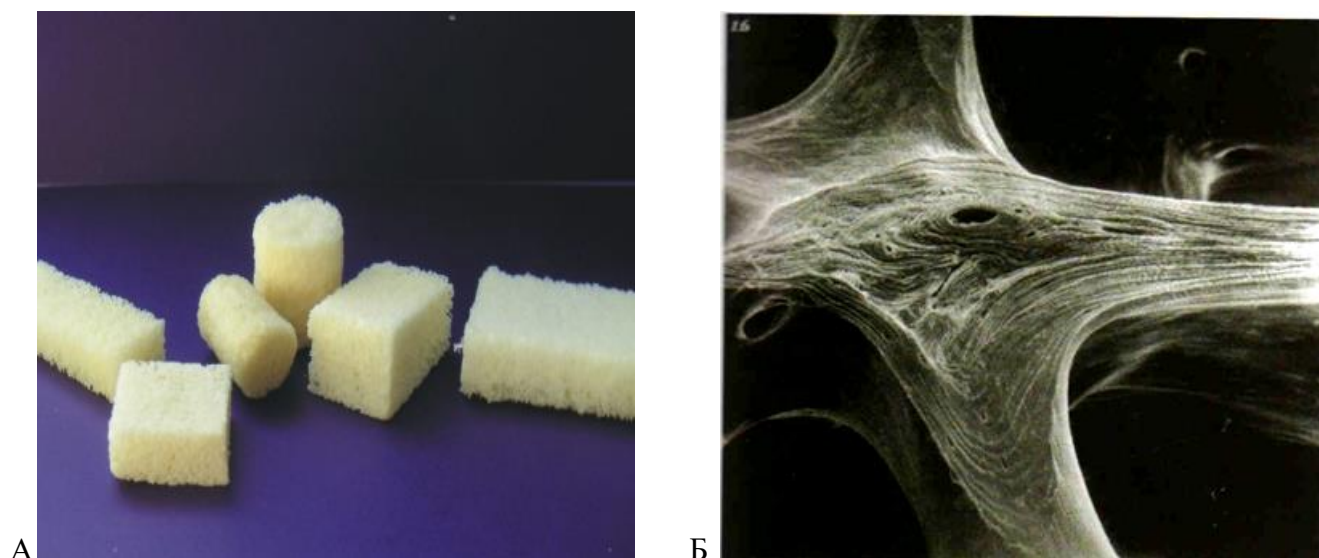


Рисунок 7 – Биопластический материал. А - деминерализованная лиофилизированная спонгиоза. Б – костные трабекулы материала (растровая электронная микроскопия, ув. 400).

При размещении в дефектах биопластического материала не допускали случаев его выстояния над интактной суставной поверхностью. Материал плотно утрамбовывали, стараясь заполнить им весь объем дефекта. Спонгиоза плотно располагалась в дефектах, не мигрировала при вправлении надколенника и пассивных движениях в суставе животного.

Во второй группе сравнения у животных для пластики дефектов применяли комбинацию ОТП и аллогенной деминерализованной лиофилизированной спонгиозы, изготовленную из головок бедренных костей кроликов по методике «Леопласт»® Самарского банка тканей. Использовали принцип «бутерброда».

ОТП делили на две части, заполняя первой частью ложе дефекта, затем размещали биопластический материал. После этого, разместив кончик шприца у края заполненного дефекта, вводили оставшуюся часть ОТП.

Послойно ушивали рану. Накладывали асептическую повязку. Иммобилизацию конечности кролика после операции не выполняли. С первого дня операции они могли свободно перемещаться по клетке. Проводили обезболивающую и антибиотикотерапию в течение 2-3 дней, осуществляя внутримышечные инъекции препаратов. Выполняли перевязки и обработку послеоперационных ран раствором антисептика (Рисунок 8).



Рисунок 8– Внешний вид послеоперационной раны коленного сустава кролика, спустя 1 неделю после оперативного вмешательства.

Длительность щажения животными конечности после моделирования дефектов обычно не превышала одной недели. Все это позволило нам оценивать регенераторные процессы после хондропластики в условиях естественной подвижности конечности животного.

Новое устройство для получения тромбоцитарных фракций крови

В рамках данной работы нами впервые предложено устройство для получения тромбоцитарных фракций крови (Патент РФ на изобретение № 2736004 от 11.11.2020). Устройство для получения тромбоцитарных фракций

плазмы крови, включает в себя два шприца с цилиндрическими корпусами разного диаметра. Шприцы выполнены из прозрачного материала. На Рисунке 9 показана схема устройства и его 3D моделирование в компьютерной программе.

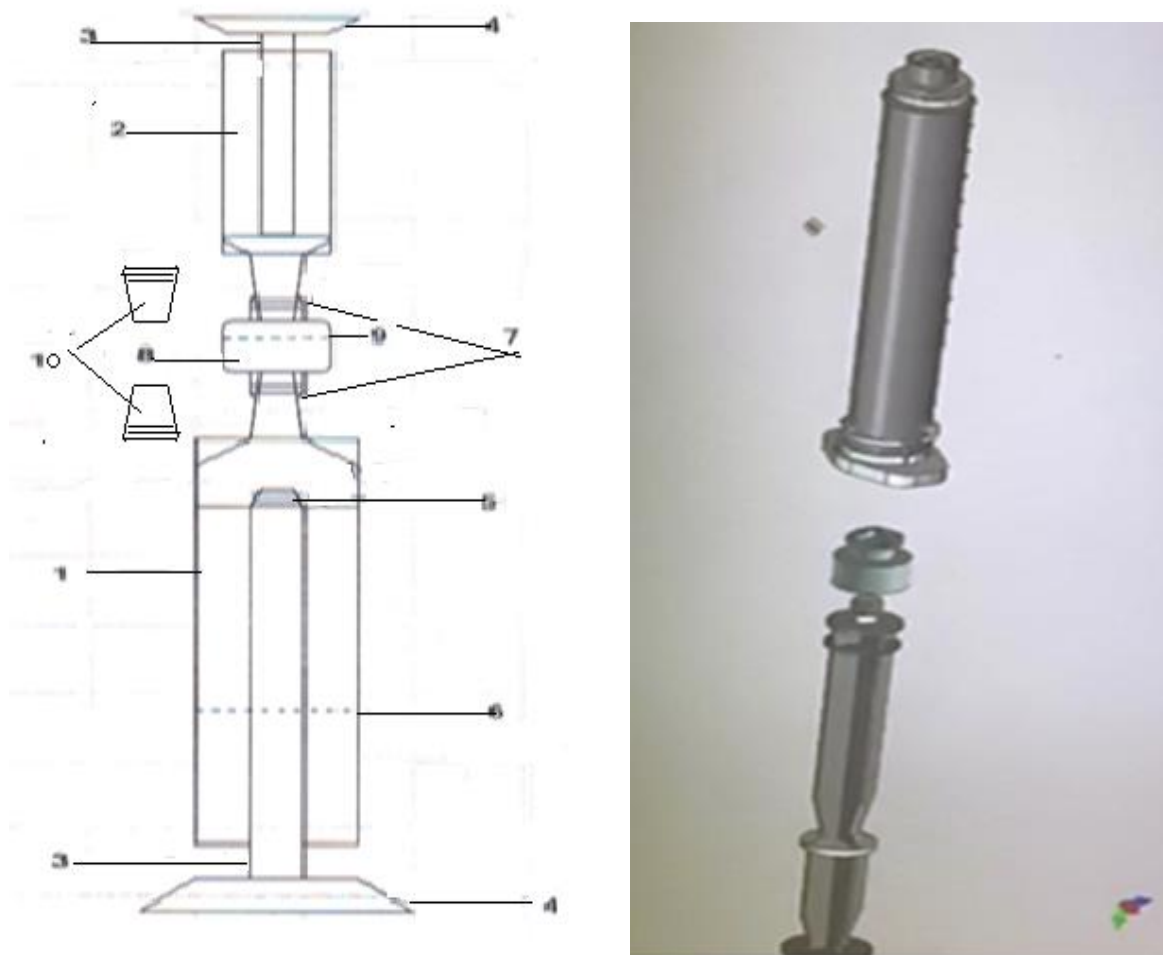


Рисунок 9 - Устройство для получения тромбоцитарных фракций плазмы крови. А – схема; Б - 3D моделирование устройства в компьютерной программе.

Первый шприц 1 и второй шприц 2 содержат поршни со штоками 3, имеющими основания 4. При этом шток 3 поршня первого шприца 1 соединен с ним резьбовым соединением 5. На корпус первого шприца 1 нанесена круговая метка 6. Дистальные концы шприцев 1 и 2 имеют внешние резьбовые соединения 7, соответствующие внутренним резьбовым соединениям цилиндрического прозрачного переходника 8 между ними.

На внешнюю поверхность переходника 8 нанесена круговая метка 9. Внешние резьбовые соединения 7 дистальных концов шприцев 1 и 2 также соответствуют внутренним резьбовым соединениям их колпачков 10.

Первый шприц имеет поршень, шток которого соединен с ним резьбовым соединением; ручка поршня имеет широкое устойчивое основание; на внешнюю поверхность корпуса первого шприца нанесена круговая метка, которая соответствует верхнему краю поршня после забора крови.

Дистальные концы первого и второго шприцев имеют внешние резьбовые соединения, соответствующие внутренним резьбовым соединениям цилиндрического прозрачного переходника между ними, катетеров и колпачков. На внешнюю поверхность корпуса переходника нанесена круговая метка, соответствующая верхнему уровню крови в первом шприце после перемещения необогащенной и обогащенной тромбоцитами фракции во второй шприц.

Устройство используют следующим образом. В условиях перевязочного кабинета или операционной проводят забор крови пациента через катетер, предварительно соединив его резьбовым соединением с дистальным концом первого шприца, до тех пор, пока верхняя граница его поршня не дойдет до метки внешней поверхности корпуса.

Отсоединяют от первого шприца катетер. Максимально смещают поршень первого шприца до упора в основание его корпуса. Закрывают дистальный конец первого шприца колпачком. Отсоединяют от поршня первого шприца шток. Размещают первый шприц в ложементе центрифуги вертикально. Осуществляют центрифугирование. Извлекают первый шприц из центрифуги. Вновь присоединяют к поршню первого шприца шток.

Размещают первый шприц вертикально на устойчивом широком основании штока его поршня. Откручивают крышку с конца первого шприца и соединяют его через переходник со вторым шприцем.

Перемещают поршень первого шприца так, чтобы верхний уровень крови достиг круговой метки переходника. Разъединяют шприцы и закрывают их колпачками. Первый шприц утилизируют. Содержимое второго шприца используют для лечебных целей. Резьбовые соединения между элементами дают возможность герметично объединять оба шприца через переходник и надежно

закрывать их колпачками для предупреждения контаминации материала и защиты от него медицинских работников.

Круговые метки на корпусе первого шприца и переходника позволяют контролировать уровни движения поршня при заборе цельной крови и перемещении полученных необогащенной и обогащенной тромбоцитами фракций во второй шприц. Это облегчает и стандартизирует работу врача, уменьшает излишние перемещения биоматериала внутри корпуса первого шприца и между ними, снижая его травматизацию и повышая качество, получаемых фракций, в частности ОТП.

Резьбовое соединение штока и поршня первого шприца позволяет осуществлять сразу несколько важных операций, влияющих на качество получаемой ОТП в **одном** шприце, избегая контакта материала с большим количеством поверхностей – забор цельной крови и, после откручивания штока, центрифугирование в нём же. Кроме того, откручивание штока поршня дает возможность удобно размещать первый шприц в ложементе центрифуг.

Широкое основание штока поршня первого шприца позволяет при необходимости устойчиво размещать его на поверхности после забора цельной крови и после центрифугирования перед присоединением второго шприца.

Предложенное нами устройство позволяет получать фракции в закрытом цикле, что дает возможность применять его как в амбулаторных, так и в стерильных условиях операционной.

3.2. Новый способ оценки качества регенератов после хондропластики с помощью компьютерной томографии

При выполнении доклинических исследований на мелких и средних животных для оценки эффективности хондропластики суставной поверхности сложно применить дорогостоящие и трудоемкие методы исследования, такие как магнитно-резонансная томография и артроскопия. Использование рентгенографии сустава позволяет выявить признаки развития остеоартроза, наличие дефекта

суставной поверхности, однако объективно оценить качество ткани, заполняющей дефект невозможно.

Нами был разработан оригинальный способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики у кроликов с помощью компьютерной томографии (Патент РФ на изобретение № 2727002 от 17.07.2020 авторов Котельникова Г.П., Долгушкина Д.А., Зельтера П. М., Лазарева В.А.).

Способ реализуется следующим образом. Животному проводят компьютерную томографию задней конечности, получая тонкие срезы до 0,5 мм с перекрытием с получением двух серий изображений с высоким и низким керенелем для оценки костных и мягкотканых структур. Выполняют построение 3D модели области коленного сустава, проводят виртуальную резекцию надколенника в режиме Volume rendering (Рисунок 10).



Рисунок 10 - КТ коленных суставов кролика с виртуальной резекцией надколенника в режиме Volume rendering. Картина интактного левого коленного сустава и правого коленного сустава после выполнения хондропластики (хорошо визуализируются два круглых дефекта на надколенниковой поверхности бедренной кости, заполненные регенератом).

Получая обзор суставной надколенниковой поверхности бедренной кости; делают предварительное заключение о восполнении дефекта регенератом относительно интактной суставной поверхности.

В костном окне переформатируют стандартные плоскости, получая косокорональную и косоаксиальную плоскости таким образом, чтобы каналы заполненных регенератами дефектов располагались параллельно косоаксиальной и перпендикулярно косокорональной плоскостям. В косоаксиальной плоскости анализируют уровень заполнения дефектов регенератами и их качество.

Подсчитывают среднюю плотность новообразованной ткани в единицах Хаунсфилда - с помощью полигональной зоны интереса, ограничивающей всю площадь регенерата; а затем отдельно тремя окружностями диаметром 1 мм в его верхнем, среднем и нижнем уровнях.

Построение 3D модели области коленного сустава с виртуальной резекцией надколенника в режиме Volume rendering позволяет получить оптимальный обзор суставной надколенниковой поверхности бедренной кости, на которой в экспериментальной модели мы создаем дефекты и выполняем их пластику. Уже на этом этапе мы можем оценить характер восполнения дефекта регенератом относительно интактной суставной поверхности (выше, ниже, на уровне и т.д.), края дефекта, их плавность, узурацию и т.д.

Полнослойные дефекты суставной поверхности для последующей пластики мы создаем с помощью зубо-врачебного бора, поэтому в дальнейшем нам важно оценить новообразованный регенерат на всю его глубину.

Переформатирование стандартных плоскостей с получением косокорональной и косоаксиальной плоскостей таким образом, чтобы каналы заполненных регенератами дефектов располагались параллельно косоаксиальной и перпендикулярно косокорональной плоскостям позволяет нам полноценно оценить регенерат – его высоту, ширину и другие параметры (Рисунок 11).

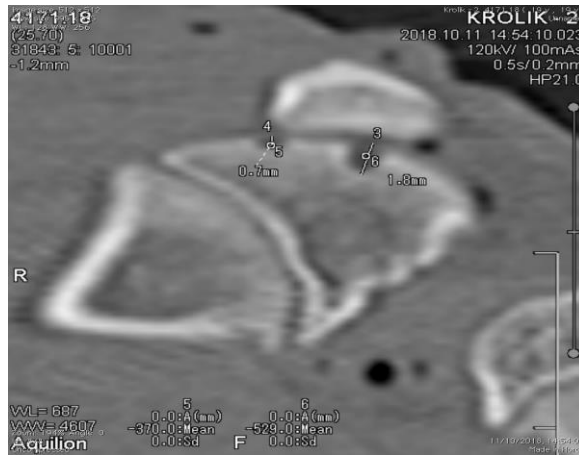


Рисунок 11 - КТ коленного сустава кролика в косоаксиальной проекции – визуальная оценка замещения дефекта, измерение глубины дефекта

Для объективной оценки качества регенерата после пластики дефектов суставной поверхности разными способами принципиальна оценка не только регенерата в целом, а также его участков – в верхнем, среднем и нижнем уровнях. Так, при создании костно-хрящевых дефектов, мы можем оценить качество новообразованного регенерата на уровне гиалинового хряща, переходной зоны и субхондральной кости.

На Рисунке 12 схематично показано выделение всего регенерата полигональной зоной интереса, а также выделение трех зон на разных уровнях с помощью трех окружностей, в которых подсчитывают среднюю плотность новообразованной ткани в единицах Хаунсфилда.

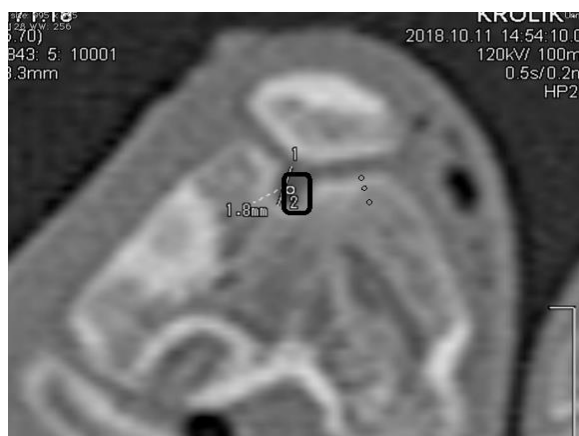


Рисунок 12 - КТ коленного сустава кролика в косоаксиальной проекции – выделение полигональной фигурой границ первоначального дефекта с подсчетом общей средней плотности новообразованной ткани

Оценка разных участков регенерата принципиальна, так как отдельный пластический материал может обладать разным регенераторным действием в зависимости от его окружения – контакта с субхондральной костью, синовиальной жидкостью и т.д. Диаметр окружности 1 мм оптимален для оценки разных уровней регенерата у кроликов (Рисунок 13) .

Способ можно применять в экспериментальных лабораториях, вивариях при выполнении доклинических исследований для оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики у кроликов.

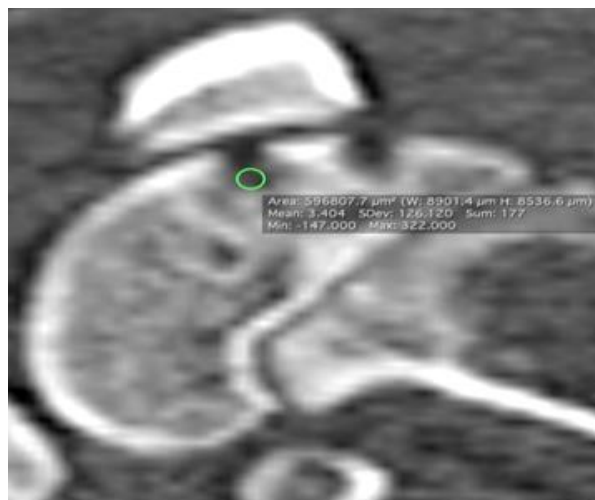


Рисунок 13 - КТ коленного сустава кролика в косоаксиальной проекции – выделение окружностью зоны субхондральной кости регенерата с подсчетом средней плотности новообразованной ткани.

Предложенный способ оценки новообразованных регенератов после хондропластики может быть применен в доклинических исследованиях у животных в качестве прижизненной оценки качества формирующихся тканевых регенератов в динамике. В том числе для возможности прогнозирования эффективности хондропластики на ранних сроках, обнаружения животных с заведомо неудовлетворительными результатами операции.

Безусловно, этот способ имеет недостатки и не может в полной мере заменить морфологическое исследование, с результатами которого мы планируем в дальнейшем сопоставить полученные данные. В то же время способ может быть

рекомендован для доклинических исследований, дизайн которых не предполагает выведение животного из эксперимента. Результаты его применения в данной работе представлены в Главе 4.

3.3. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки спектральных характеристик суставной поверхности человека и животных

Возможности метода рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния для получения спектральных характеристик суставной поверхности были оценены нами в нескольких сериях экспериментов. В первой серии экспериментов исследовали суставные поверхности бедренных костей, резецированных при эндопротезировании коленного сустава у человека. Во второй серии экспериментов исследовали спектральные характеристики надколенниковой суставной поверхности бедренных костей кроликов после выполнения разных видов хондропластики.

Исследование суставных поверхностей костей, резецированных при эндопротезировании коленного сустава у человека.

В качестве объектов исследования были использованы образцы суставных поверхностей бедренной кости, полученные во время операции эндопротезирования, выполняемой пациентам по поводу деформирующего остеоартроза коленного сустава. После резекции суставного конца бедренной кости с помощью осциляторной пилы из неё выпиливали образцы для исследования. Они представляли собой костно-хрящевые фрагменты, имеющие участки суставной поверхности с разной степенью повреждения, которую оценивали визуально.

Полученные образцы промывали в 3 % растворе перекиси водорода, 0,9 % физиологическом растворе до чистого раствора, в котором и транспортировали в лабораторию для выполнения рамановской спектроскопии.

На поверхности этих образцов по макроскопической картине выделяли зоны неповреждённого суставного гиалинового хряща, которые соответствовали

ненагружаемой суставной поверхности, а также зоны с глубоким повреждением гиалинового хряща вплоть до субхондральной кости (Рисунок 14).

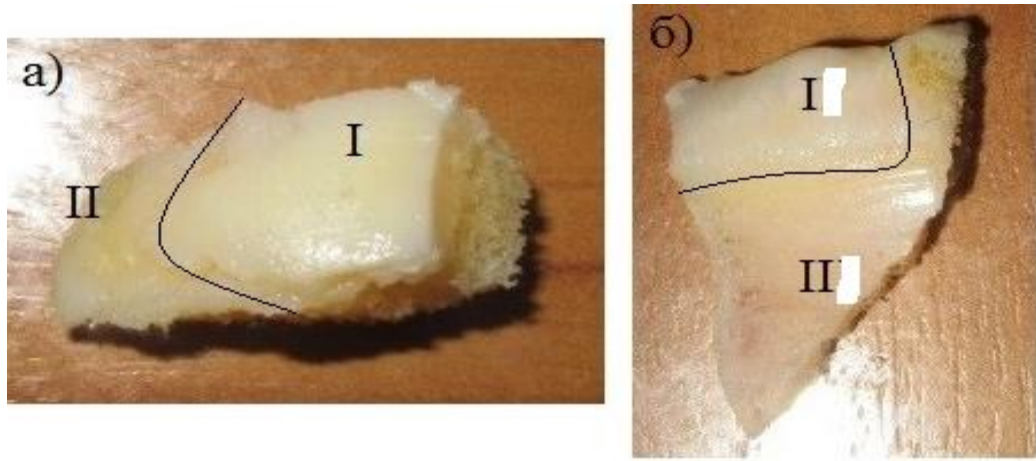


Рисунок 14 – Исследуемые с помощью СКР образцы суставной поверхности бедренной кости человека: I – зона интактного хряща; II – зона полнослойного дефекта.

Основные спектральные изменения, полученные при исследовании разных зон суставной поверхности, отражены на Рисунке 15.

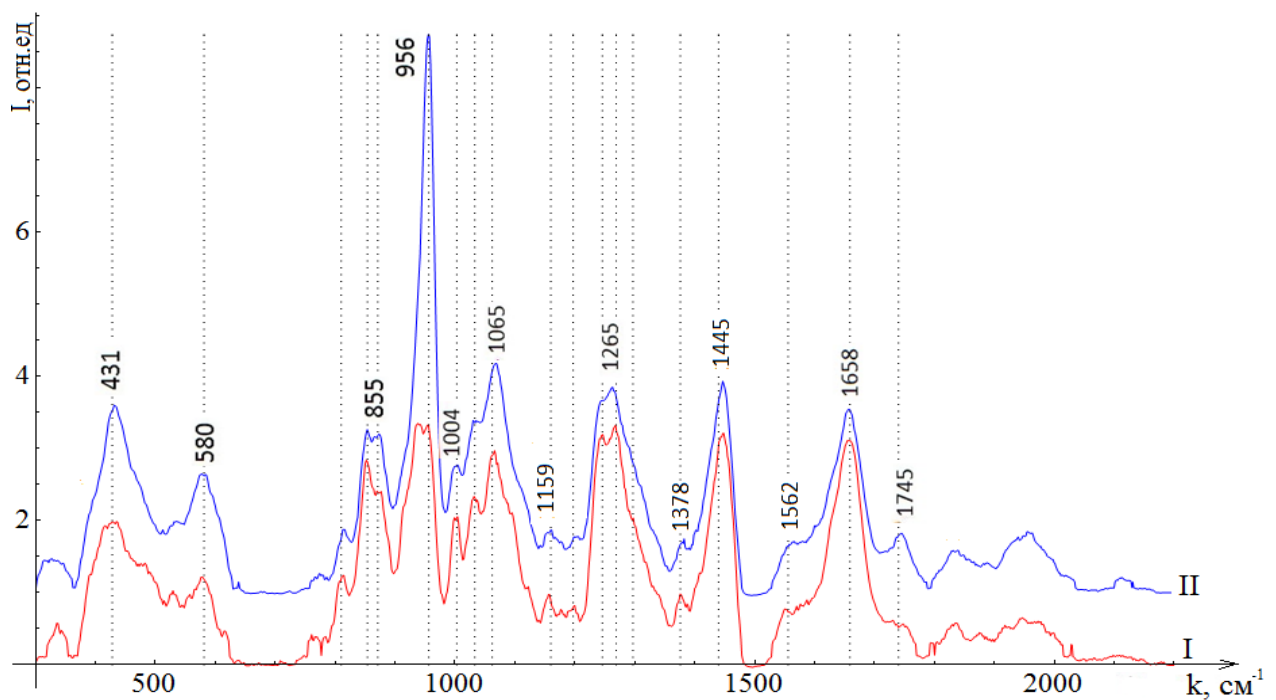


Рисунок 15. – Усредненные рамановские спектры I – зона неповреждённого гиалинового хряща, II- зона полнослойного дефекта.

Основные спектральные различия зон суставной поверхности состояли в изменении волновых чисел линий ионов фосфата (956 см⁻¹) и амидов (Рисунок

13. 2). При деструкции гиалинового хряща в зоне его повреждения происходит усиление пиков на волновых числах 431 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_2) Холестерин, эфиры холестерина), 956 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_1) (P-O симметричное валентное)), 1065 см^{-1} (CO_3^{2-} , (C-Оплоскостное валентное), 1745 см^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ липиды) и ослабление интенсивности пиков на волновых числах 1562 см^{-1} (амид II), 1658 см^{-1} (амид I), при этом исчезает линия на 1244 см^{-1} (амид III).

Это связано с тем, что при поражении хрящевой ткани происходит его постепенное разрушение вплоть до кальцифицирующей зоны и субхондральной кости, что проявляется в увеличении линий на 956 см^{-1} , соответствующей волновому числу ионов фосфата. Расшифровка основных линий приведена в Таблице 6.

Таблица 6 – Расшифровка спектров КР зон суставной поверхности образцов, полученных при эндопротезировании коленного сустава у людей

<i>Волновое число, см^{-1}</i>	<i>Вещество, колебание</i>
429-431	PO_4^{3-} (ν_2). Холестерин, эфиры холестерина[16]
580	PO_4^{3-} (ν_4)-(P-O деформационное) [16]
855	Моносахариды[16]
956	PO_4^{3-} (ν_1) (P-O симметричное валентное) [16]
1004	«Дыхательная» мода бензольного кольца фенилаланина[16]
1046	PO_4^{3-} (ν_3) (P-O асимметричное валентное) [16]
1065-1070	CO_3^{2-} (C-Оплоскостное валентное) [16]
1159	Пираноз (углевод) [16]
1183	Цитозин, гуанин, аденин[16]
1244-1271	Амид III, C-N-H валентное[16]
1445	CH_2 деформационное крутильное[16]
1554-1564	Амид II [16]
1655-1660	Амид I, C-C-H валентное[16]
1745	$\nu(\text{C}=\text{O})$ липиды[16]

Для оценки состояния суставной поверхности нами были использованы следующие оптические коэффициенты: отношение «минерал/органический матрикс» (М) для оценки степени минерализации хряща:

$$M = \frac{I_{(PO_4)^{3-}}}{I_{amidI}} ;$$

отношение «карбонат/фосфат» (К), характеризующее глубокое поражение гиалинового хряща:

$$K = \frac{I_{(CO_3)^{2-}}}{I_{(PO_4)^{3-}}} ;$$

оптический коэффициент S, показывающий соотношение органической составляющей при поражении гиалинового хряща:

$$S = \frac{I_{amidI}}{I_{amidIII}}$$

где I_i – значения интенсивности показателей на волновых числах

Погрешность определения оптических коэффициентов не превышала 6,3%. Были построены двумерные зависимости оптических коэффициентов М, К и S (Рисунок 16).

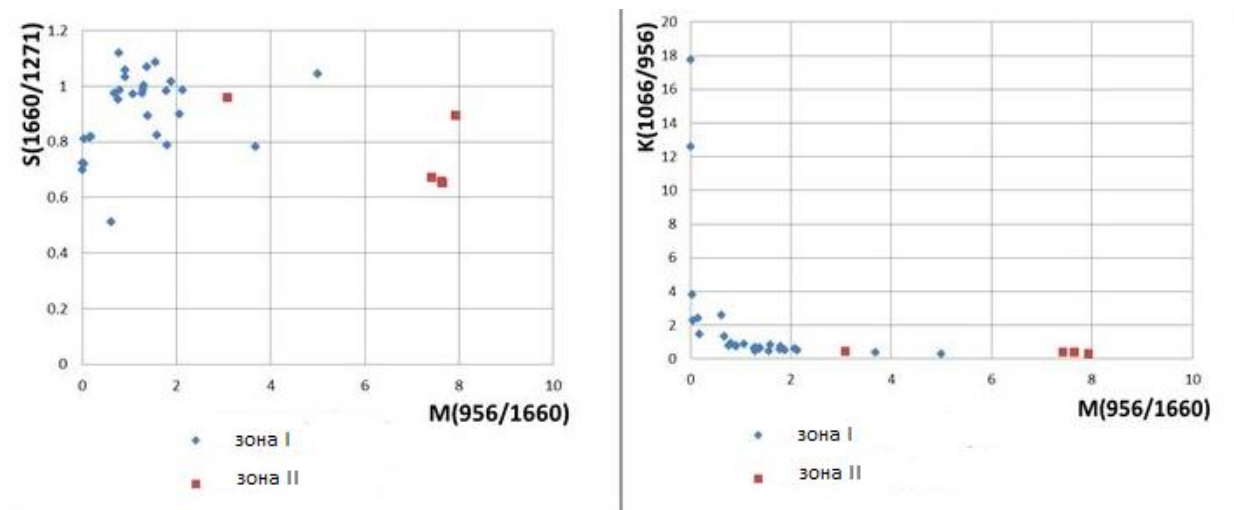


Рисунок. 16. – Двумерные диаграммы оптических коэффициентов зон суставной поверхности исследуемых образцов

Анализ двумерных диаграмм показал, что с помощью введенных оптических коэффициентов можно достоверно верифицировать участки поражения хрящевой ткани на суставной поверхности. Так для неповреждённого хряща значения оптических коэффициентов составляют: $0,5 < S < 1,1$; $0,45 < K < 4$ и характеризуются значительно меньшим содержанием амида I и карбоната, чем в зоне с повреждённой хрящевой тканью вплоть до субхондральной кости, в которой увеличивается содержание фосфата и карбоната и уменьшается содержание амида I - значения оптического коэффициента $7 < M < 8$.

Таким образом, при деструкции гиалинового хряща в зоне его повреждения происходит усиление пиков на волновых числах 431 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_2) Холестерин, эфиры холестерина), 956 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_1) (P-O симметричное валентное)), 1065 см^{-1} (CO_3^{2-} , (C-Оплоскостное валентное), 1745 см^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ липиды) и ослабление интенсивности пиков на волновых числах 1562 см^{-1} (амид II), 1658 см^{-1} (амид I), при этом исчезает линия на 1244 см^{-1} (амид III).

Спектроскопия комбинационного рассеяния позволяет проводить быстрый неинвазивный контроль состояния суставной поверхности образцов с достоверным выявлением локальных участков поражения гиалинового хряща, появлении характерных спектральных характеристик, свидетельствующих о разной глубине поражения и характере ткани на поверхности дефекта.

Применение СКР для оценки суставной поверхности после хондропластики с применением обогащенной тромбоцитами плазмы

После выведения животных из эксперимента через 2 недели, 1 месяц и 3 месяца после операции образцы дистальных эпифизов бедренных костей после соответствующей пробоподготовки передавали для исследования в лабораторию Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева.

Суставные поверхности образцов исследовали с помощью экспериментального стенда, реализующего метод СКР, который состоит из высокоразрешающего цифрового спектрометра Shamrock sr-303i со встроенной

охлаждаемой камерой DV420A-OE (спектральный диапазон 200-1200 нм), волоконно-оптическим зондом RPB-785 для спектроскопии КР, совмещённым с лазерным модулем LuxxMaster LML-785.0RB-04 (длина волны лазерного излучения - 785 нм, ширина линии $<0,1$ нм) и линейного транслятора (шаг сканирования в эксперименте 0,2 мм). В образцах исследовали непосредственно зону пластики, пограничные и интактные зоны суставной поверхности.

Обработка полученных спектров КР была выполнена в программе Wolfram Mathematica. Исследуемый спектр при обработке очищали от шумов сглаживающим медианным фильтром (5 точек), определяли в исследуемом диапазоне 700-2200 см^{-1} при помощи итерационного алгоритма аппроксимирующую линию (полином пятой степени) автофлуоресцентной составляющей, а затем вычитали эту составляющую, в результате получали выделенный спектр КР. В образцах исследовали зону пластики, пограничные и интактные зоны суставной поверхности (Рисунок 17).

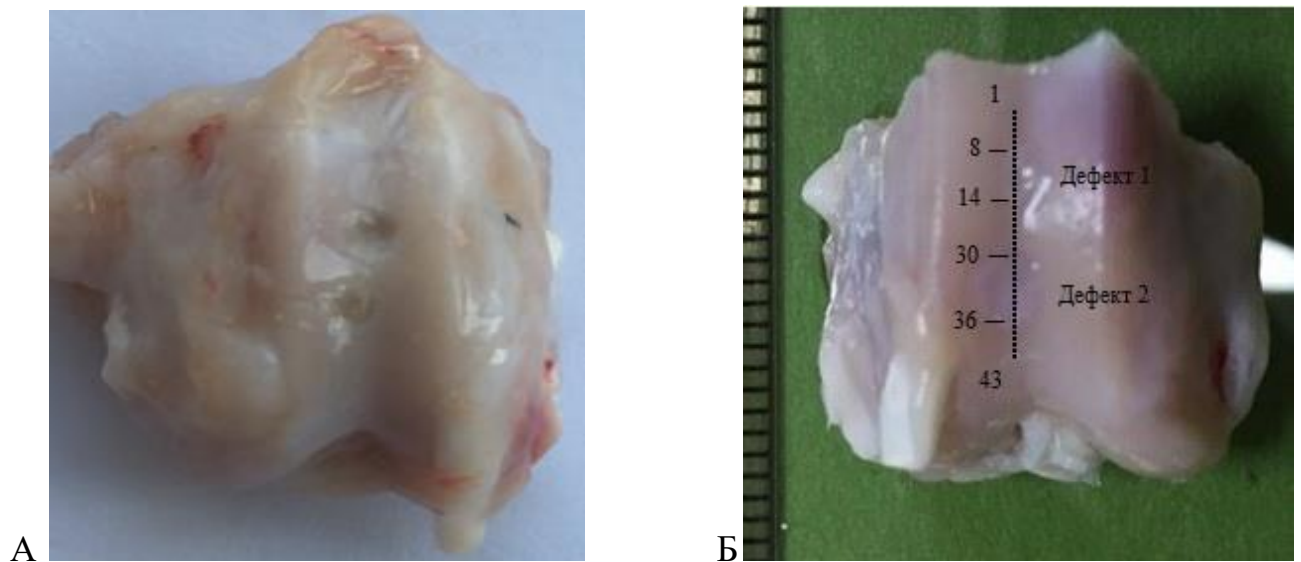


Рисунок 17 – Макропрепараты образцов дистального эпифиза бедренной кости кролика после пластики дефектов ОТП. А- 2 недели после выполнения операции (регенераты желто-серого цвета, не доходят до уровня интактной суставной поверхности); Б – 3 месяца после хондропластики (регенераты мутного голубовато-белого цвета полностью восполняют дефекты - схематично показаны точки для выполнения СКР в зонах регенератов, пограничной и интактной зонах суставной поверхности).

В Таблице 7 представлена расшифровка спектров КР.

Таблица 7 – Расшифровка спектров КР.

<i>k, см⁻¹</i>	<i>Колебание</i>	<i>Вещество (группа)</i>
812	C-C растяжение	Протеин
850	(s)* C-C растяжение	Пролин
874	C-C растяжение	Гидроксипролин
885		Гидроксипролин
925	C-C растяжение	Пролин
935	(ms-s) C-O-C linkage	Гликозаминогликаны
956	ν_1	PO_4^{3-}
993	(s)	Хондроитин-6-сульфат
1002	ν (C-C)	Фенилаланин
1033	C-C растяжение	Фенилаланин
1069	(s) CO_3^- симметричное растяжение	CO_3^{2-}
1101	(ms) C-OH bend	Гиалуроновая кислота
1123		Пиранозное кольцо
1165		Пиранозное кольцо
1200	(m) CH_2 – twist	Гиалуроновая кислота
1242	(ms) bending: random coil NH_2	Амид III
1280	(ms) (NH_2) bend	Амид III
1340	(s) C-H bend	Гликозаминогликаны
1373	(s) COO^- симметричное растяжение CH_3 деформация	Гликозаминогликаны
1400	(m) COO^- симметричное растяжение	Гликозаминогликаны
1420	COO^- симметричное растяжение CH_3 bend	Гликозаминогликаны
1439	CH_2/CH_3 scissoring	Коллаген и другие белки
1551	(ms)	Амид II
1587	(w) ν (C-C-H)	aromatic ring
1660	(ms)	Амид I
1691	(ms)	Амид I
1744	ν (C=O)	Липиды

В результате исследования суставных поверхностей образцов после пластики дефектов ОТП в динамике получены следующие усредненные спектры КР зон пластики, пограничных и интактных зон (Рисунки 18, 19).

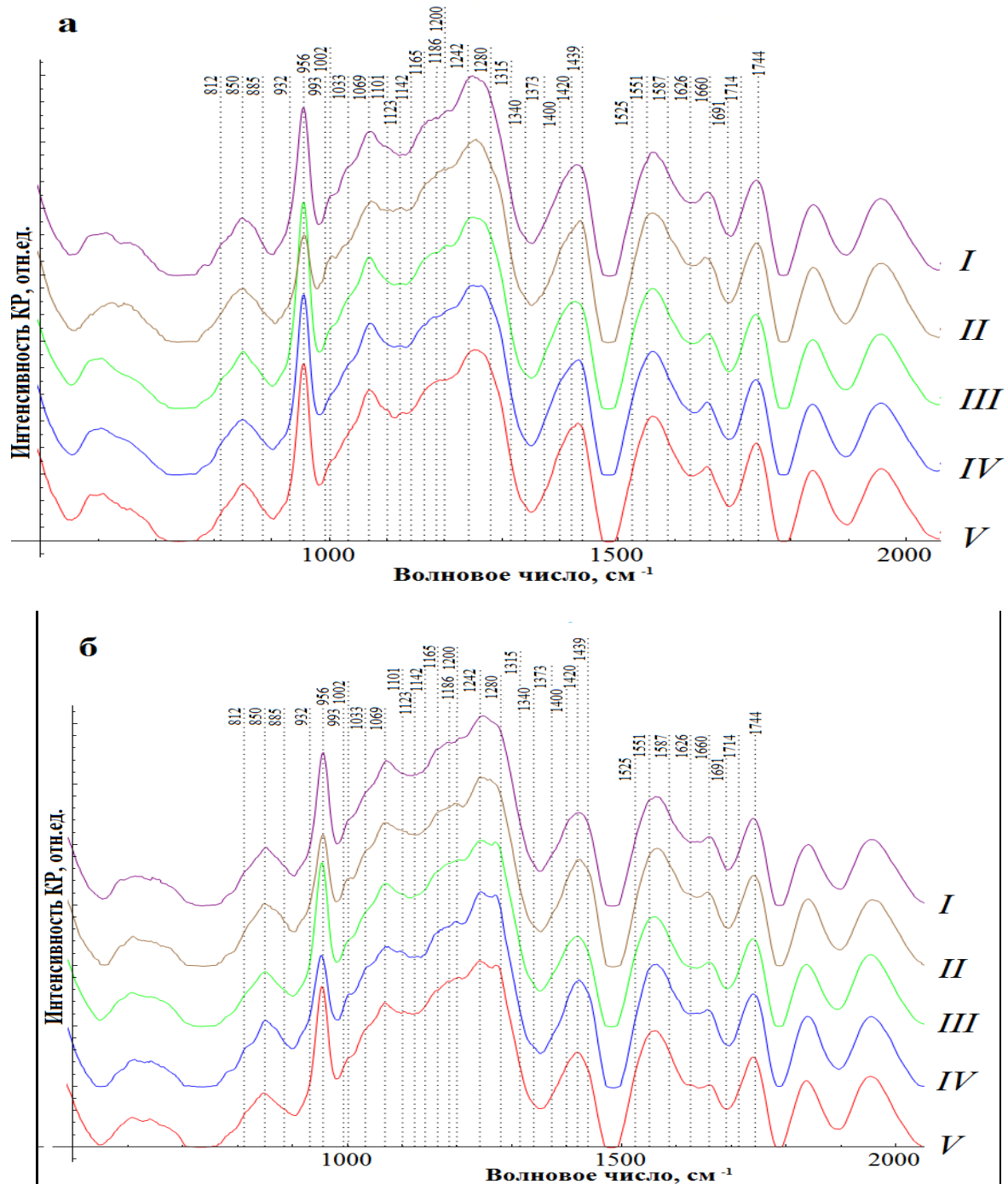


Рисунок 18– Усредненные спектры КР зон суставной поверхности дистального эпифиза бедренной кости кроликов после замещения дефектов ОТП. Сроки после операции: а) 2 недели; б) 1 месяц где I – пограничная зона 1; II-зона пластики 1; III- интактный хрящ; IV-Зона пластики 2; V- пограничная зона 2.

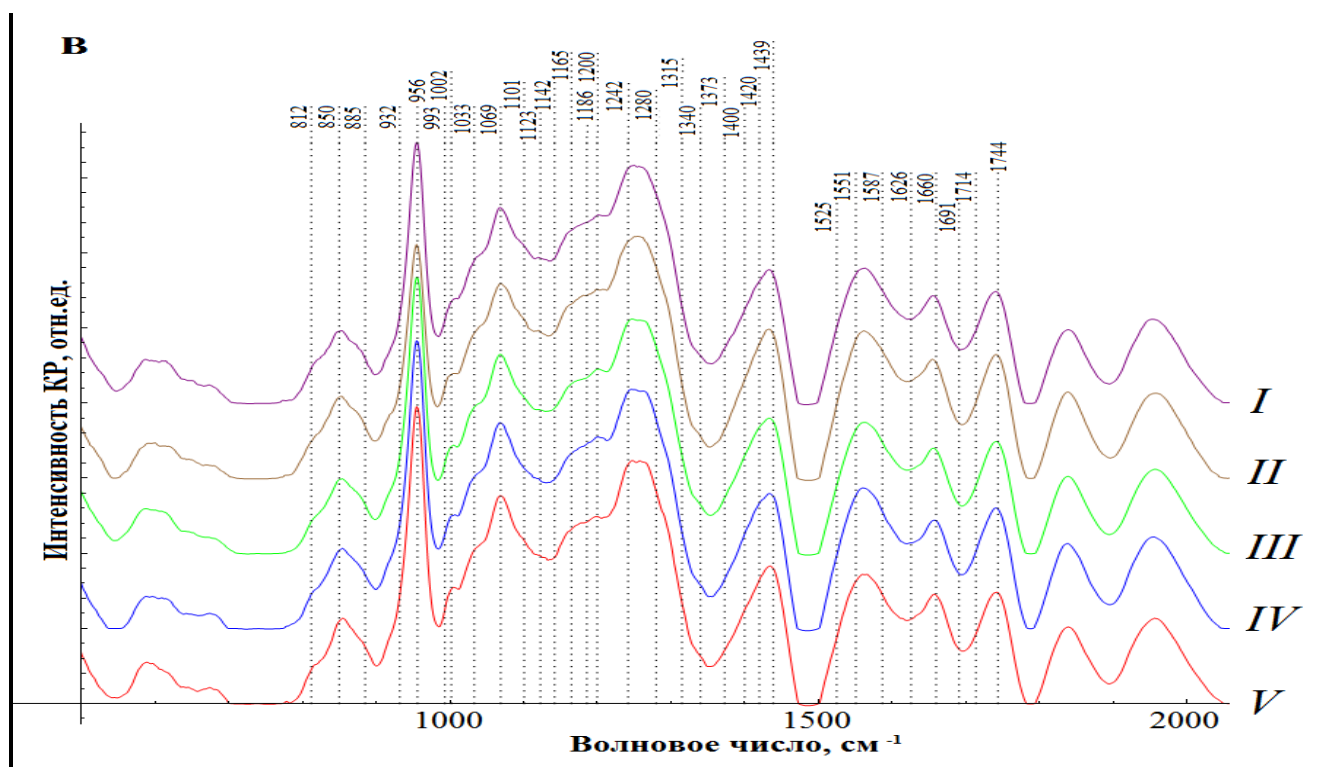


Рисунок 19– Усредненные спектры КР зон суставной поверхности дистального эпифиза бедренной кости кроликов после замещения дефектов ОТП. Срок после операции: в) 3 месяца, где I – пограничная зона 1; II-зона пластики 1; III-интактный хрящ; IV-Зона пластики 2; V- пограничная зона 2.

Основные спектральные различия интенсивностей пограничной зоны, зоны пластики и интактного хряща наблюдаются на линиях 956 см^{-1} ($\nu_1 \text{ PO}_4^{3-}$), 1002 см^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{C})$ Фенилаланин), 1069 см^{-1} ((s) симметричное растяжение CO_3^{2-}).

При этом относительно постоянными линиями интенсивностями можно считать 1587 см^{-1} (амид II), 1242 см^{-1} (амид III) и 1280 см^{-1} (амид III).

Таким образом, коллаген - основной белок в составе волокон соединительной ткани, остается постоянным при исследовании суставной поверхности дистального эпифиза бедренной кости кролика после замещения дефектов ОТП.

Для дальнейшего анализа и разрешения перекрытий соседних линий проведено разложение спектров на линии в программе для обработки и аппроксимации данных - MagicPlotPro.

Деконволюция спектров осуществлена путем подготовки шаблона пробных функций Гаусса отдельных пиков (ширина и положение пика фиксировали) с

последующей применением его к экспериментальным спектрам для нахождения амплитуды полос.

Основные изменения в спектрах суставной поверхности дистального эпифиза бедренной кости кролика при различных сроках и зонах пластики, пограничных зон и зоны интактного гиалинового хряща наблюдаются для линий 956 см^{-1} ($\nu_1 \text{ PO}_4^{3-}$), 1002 см^{-1} ($\nu \text{ (C-C)}$ Фенилаланин), 1069 см^{-1} ((s) симметричное растяжение CO_3^{2-}). Для оценки качества поверхности новообразованного регенерата (коэффициент К) была применена следующая формула: $K = I_{956} / I_{1660}$, где I_{956} – значение интенсивности на волновом числе 956 см^{-1} (PO_4^{3-}), I_{1660} – значение интенсивности на волновом числе 1660 см^{-1} (Амид I) – Рисунок 20.

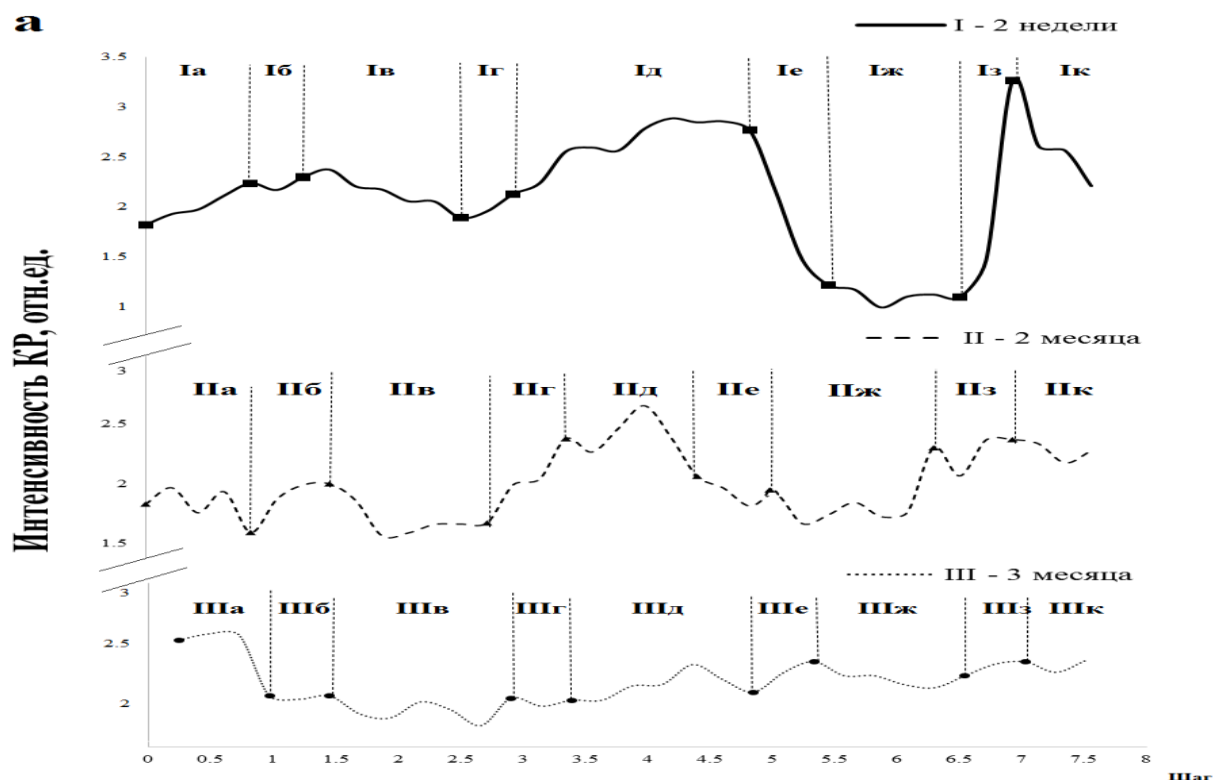


Рисунок 20 – Зависимость коэффициента от горизонтального смещения исследуемого образца (спектры разнесены относительно оси интенсивности): где б,г- пограничная зона 1; в- зона пластики 1; а,д,к- зона интактного хряща; ж-зона пластики 2; е,з,к- пограничная зона 2.

Хорошо видно, что на ранних сроках наблюдения через 2 недели и 1 месяц после пластики поверхность зон замещения дефекта ОТП по своим спектральным характеристикам не приближались к аналогичным характеристикам как пограничных зон, так и зон интактного хряща. Зона пластики характеризовалась снижением интенсивностей 956 см^{-1} ($\nu_1 \text{ PO}_4^{3-}$), 1002 см^{-1} ($\nu (\text{C}-\text{C})$ Фенилаланин), 1069 см^{-1} ((s) симметричное растяжение CO_3^{2-}).

В то время как к 3 месяцу после операции спектральные характеристики зон пластики уже приближались к характеристикам пограничных зон и были сравнимы с параметрами поверхности интактного хряща. Это свидетельствовало об эффективной регенерации ткани после пластики ОТП. Однако подтвердить органотипичность новообразованных регенератов можно только после морфологического исследования.

Спектроскопия комбинационного рассеяния может быть применена для оценки качества восстановления суставной поверхности после выполнения хондропластики при анализе макропрепаратов. Выделение значимых спектральных характеристик, коэффициентов может обеспечить создание моделей «идеального» состояния суставной поверхности.

Разработка компьютерных программ, которые будут соотносить реальное состояние суставной поверхности с идеально возможной, позволит ускорить и персонализировать оценку состояния суставной поверхности с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния.

Таким образом, нами модифицированная методика получения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов. Выявлены и представлены особенности ее применения при выполнении хондропластики, в том числе в комбинации с деминерализованным костным биоматериалом.

Представлен разработанный нами оригинальный способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики с помощью компьютерной томографии, который может быть апробирован при выполнении инструментальных исследований у людей.

Предложена и проанализирована возможность неинвазивной оценки качества суставной поверхности с помощью рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния – как в эксперименте у животных, так и при исследовании биоматериалов человека. Зная качественные и количественные спектральные характеристики той или иной поверхности в норме, можно диагностировать её патологические изменения. В свою очередь, изучив значимые спектральные показатели разных патологических процессов, можно выявлять их с помощью данного метода, не выполняя трудозатратные и долговременные морфологические исследования.

ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАЗНЫХ ВИДОВ ХОНДРОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

4.1. Оценка результатов клинического исследования

При обследовании кроликов в динамике в послеоперационном периоде нами был применен способ оценки структурно-функционального состояния задних конечностей у кроликов в эксперименте (Д.А. Долгушкин, 2011). Средние величины полученных результатов обследования животных групп сравнения представлены в Таблице 8

. Таблица 8– Динамика оценки состояния конечности кроликов групп сравнения в послеоперационном периоде

Симптом (в баллах)	Норма	Срок после операции	Группы животных			Статистическая значимость отличий групп		
			I ДКМ	II (ОТП)	III (ОТП+ ДКМ)	pI-II	pI-III	pII-III
Опороспособность нижней конечности	3	2 нед	2,1±0,3	2,5±0,2	2,4±0,2	<0,001	0,001	0,314
		1 мес	2,8±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	0,006	0,006	1,000
		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Болезненность при пальпации сустава	3	2 нед	2,5±0,1	2,9±0,1	2,8±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		1 мес	2,8±0,2	2,9±0,1	2,9±0,1	0,126	0,126	1,000
		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Отек тканей коленного сустава	3	2 нед	2,3±0,2	2,9±0,1	2,8±0,2	<0,001	<0,001	0,126
		1 мес	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	1,000	1,000	1,000
		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Окружность коленного	3	2 нед	2,2±0,2	2,9±0,1	2,7±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
		1 мес	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	1,000	1,000	1,000

сустава		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Локальная гипертермия	3	2 нед	2,7±0,2	2,9±0,1	2,8±0,1	<0,001	0,126	0,006
		1 мес	3±0	2,9±0,1	2,9±0,1	<0,001	<0,001	1,000
		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Ограничение объема движений в коленном суставе	3	2 нед	2,8±0,1	2,9±0,1	2,8±0,2	0,006	1,000	0,126
		1 мес	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	1,000	1,000	1,000
		3 мес	2,8±0,2	3±0	3±0	<0,001	<0,001	1,000
Гипотрофия мышц	3	2 нед	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	1,000	1,000	1,000
		1 мес	3±0	2,9±0,1	2,9±0,1	<0,001	<0,001	1,000
		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Состояние раны	3	2 нед	2,8±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	0,006	0,006	1,000
		1 мес	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	1,000	1,000	1,000
		3 мес	3±0	3±0	3±0	1,000	1,000	1,000
Общее количество баллов	24	2 нед	20,3±0,1	22,8±0,1	22,1±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
		1 мес	23,2±0,3	23,2±0,1	23,2±0,1	1,000	1,000	1,000
		3 мес	23,8±0,1	24±0	24±0	<0,001	<0,001	1,000

Следует ещё раз подчеркнуть, что медикаментозная поддержка в раннем послеоперационном периоде у животных групп сравнения ничем не отличалась. Кролики получали в первые три дня после операции обезболивающий препарат и антибиотик для профилактики инфекционных осложнений. Оба препарата вводили внутримышечно. Тем не менее, в раннем послеоперационном периоде наблюдали значимые отличия между группами.

В частности, в группах животных, которым выполняли пластику дефектов суставной поверхности обогащенной тромбоцитами аутоплазмой реактивное воспаление в мягких тканях операционной области купировалось уже к концу

первой недели. У большинства этих животных в течение двух недель полностью восстанавливалась опороспособность задней конечности, объем движений в суставе, пастозности периартикулярных тканей к этому времени также не наблюдали (Рисунок 21).



Рисунок 21 – Коленные суставы кролика из второй группы: слева – интактный сустав; справа – пластика ОТП, спустя 2 недели: отмечается купирование периартикулярного отека, рана сухая, явлений синовита нет.

При использовании комбинации ОТП с деминерализованным костным материалом у большинства животных состояние периоперационной области нормализовалось к третьей неделе наблюдения. При этом в группе кроликов, которым была выполнена монопластика дефектов деминерализованной спонгиозой, встречались достаточно длительные реактивные процессы в области выполнения операции, сопровождающиеся болезненностью, ограничением движения сустава, пастозностью мягких тканей и даже синовитом, при котором приходилось осуществлять пункцию сустава (Рисунок 22).

Наблюдаемые в группах животных явления можно объяснить противовоспалительным эффектом обогащенной тромбоцитами плазмы, который проявился, как при монопластике дефектов ОТП, так и при сочетании её с деминерализованным костным материалом. В то же время использование для

пластики только спонгиозы сопровождалось у многих животных реактивным процессом в зоне оперативного вмешательства.

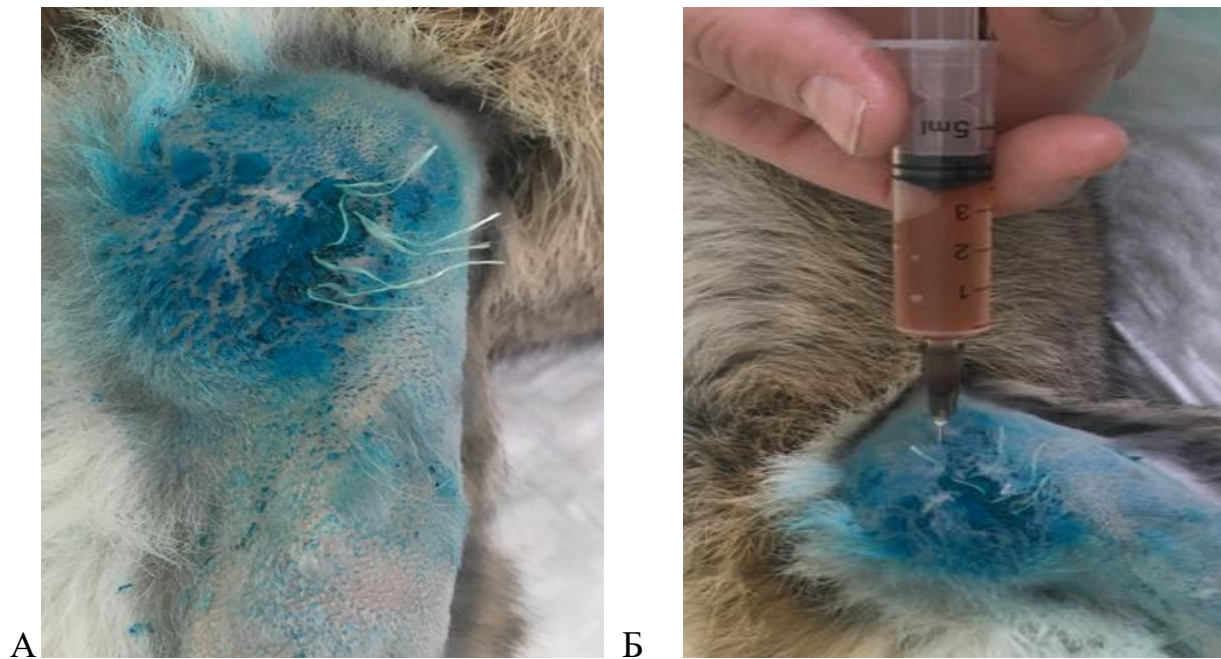


Рисунок 22 – Коленный сустав кролика из первой группы – пластика деминерализованным костным материалом, спустя 2 недели: А - отмечается периартикулярный отек, синовит, рана сухая; Б – пункция сустава.

К 3 месяцам во всех трех группах функциональные способности суставов кроликов были близки к нормальным значениям (Рисунок 23)

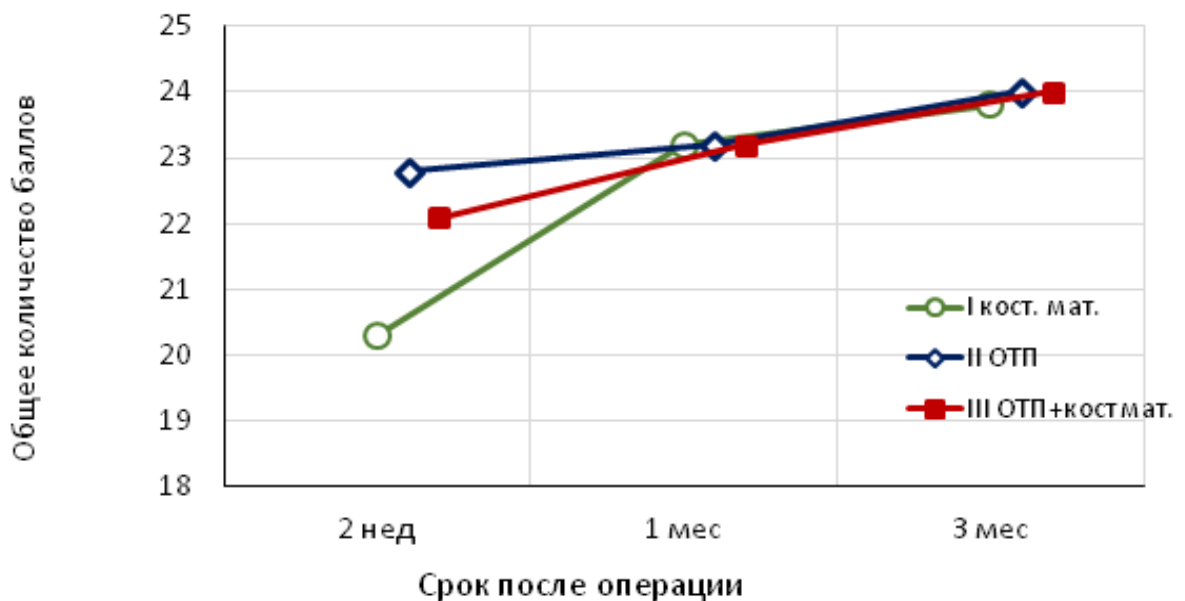


Рисунок 23 – Динамика изменения показателей оценки состояния конечностей кроликов групп сравнения в послеоперационном периоде

4.2 Анализ результатов термографии и рентгенографии

Анализ полученных данных подтверждал результаты, полученные при выполнении локальной термометрии области коленного сустава при осмотре животных. Термографическое исследование выявило купирование температурной реакции периартикулярных тканей после операции уже ко второй неделе в группе животных, пластику дефектов у которых выполняли с помощью обогащенной тромбоцитами плазмы.

У кроликов, дефекты суставной поверхности которых замещали комбинацией ОТП и деминерализованного костного материала температурная реакция местных тканей купировалась на неделю позже (Таблица 9).

Таблица 9 - Динамика результатов термографии области коленного сустава у животных групп сравнения в послеоперационном периоде

Признак	Срок после операции	Группы животных			Статистическая значимость отличий групп		
		I (ДКМ)	II (ОТП)	III (ОТП+ ДКМ)	pI-II	pI-III	pII-III
Средняя температура, °C	2 нед	34,56±0,05	32,88±0,04	33,87±0,01	<0,001	<0,001	<0,001
	1 мес	32,33±0,03	31,32±0,01	31,02±0,03	<0,001	<0,001	<0,001
	3 мес	30,64±0,02	30,12±0,02	30,35±0,02	<0,001	<0,001	<0,001

В группе животных, замещение дефектов у которых выполняли только деминерализованной спонгиозой, термография выявляла локальную гипертермию у некоторых особей и спустя месяц после оперативного вмешательства, хотя функция сустава к этому моменту у них была восстановлена.

Следует отметить, что ни одно животное из этой группы не было выведено из эксперимента. У тех нескольких кроликов первой группы, у которых наблюдали выраженный синовит, после пункции процесс в течение двух недель купировался.

Данные результаты подтверждают имеющийся у аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы противовоспалительный эффект.

Графики динамики изменения показателей термографии области коленного сустава у животных групп сравнения в послеоперационном периоде представлены на Рисунке 24.

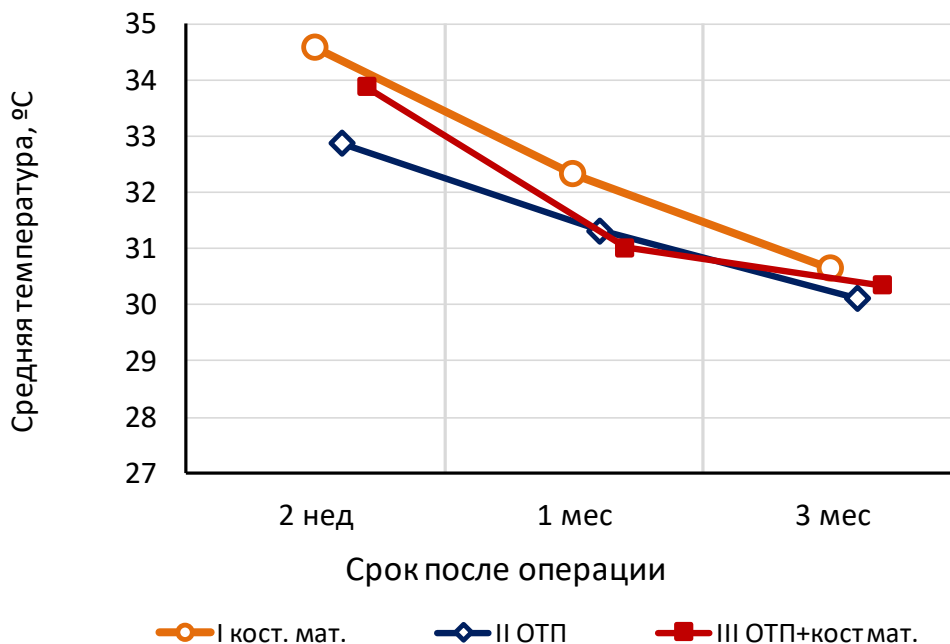


Рисунок 24 - Графики динамики изменения показателей термографии области коленного сустава у животных групп сравнения в послеоперационном периоде.

При выполнении **рентгенографии** в прямой и боковой проекции животным трех групп сравнения в раннем послеоперационном периоде не выявляли значимых отличий в рентгенологической картине — признаков деструкции структур сустава спустя 2 недели и 1 месяц выявлено не было.

Однако в группе кроликов, пластику дефектов суставной поверхности которых выполняли деминерализованным костным материалом, у некоторых животных уже через 1 месяц после операции наблюдали постепенное развитие деструктивно-дистрофических процессов. Более ярко это проявилось на позднем сроке наблюдения — спустя 3 месяца после выполнения операции.

У ряда животных этой группы отмечали появление неравномерного сужения суставной щели, появление очагов остеосклероза, единичных остеофитов.

Необходимо отметить, что эти признаки, выявлявшиеся рентгенологически, как правило, еще не сказывались на функции задних конечностей животных. Однако известно, что данные процессы без соответствующего лечения прогрессируют и приводят к развитию деструктивно-дистрофического поражения коленного сустава.

Динамика выявления рентгенологических признаков прогрессирования остеоартроза коленных суставов животных групп сравнения по С.П. Миронову с соавторами представлена в Таблице 10 и на Рисунке 25.

Таблица 10 – Динамика выявления рентгенологических признаков остеоартроза у животных групп сравнения (по С.П. Миронову с соавторами) в баллах

Симптом (в баллах)	Норма	Срок после операции	Группы животных			Статистическая значимость отличий групп		
			I (кост. мат.)	II (ОТП)	III (ОТП+кост. мат)	pI-II	pI-III	pII-III
Сужение суставной щели	5	2 нед	5±0	5±0	5±0	1,000	1,000	1,000
		1 мес	4,5±0,2	4,9±0,1	4,8±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		3 мес	3,9±0,1	5±0	4,9±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Состояние мышечков	5	2 нед	5±0	5±0	5±0	1,000	1,000	1,000
		1 мес	4,8±0,1	5±0	4,9±0,1	<0,001	0,006	<0,001
		3 мес	3,8±0,2	5±0	4,9±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Деформация сустава	5	2 нед	5±0	5±0	5±0	1,000	1,000	1,000
		1 мес	4,1±0,2	5±0	5±0	<0,001	<0,001	1,000
		3 мес	3,5±0,3	5±0	5±0	<0,001	<0,001	1,000
Общее количество баллов	15	2 нед	15±0	15±0	15±0	1,000	1,000	1,000
		1 мес	13,4±0,2	14,9±0,1	14,7±0,2	<0,001	<0,001	<0,001
		3 мес	11,2±0,1	15±0	14,8±0,1	<0,001	<0,001	<0,001

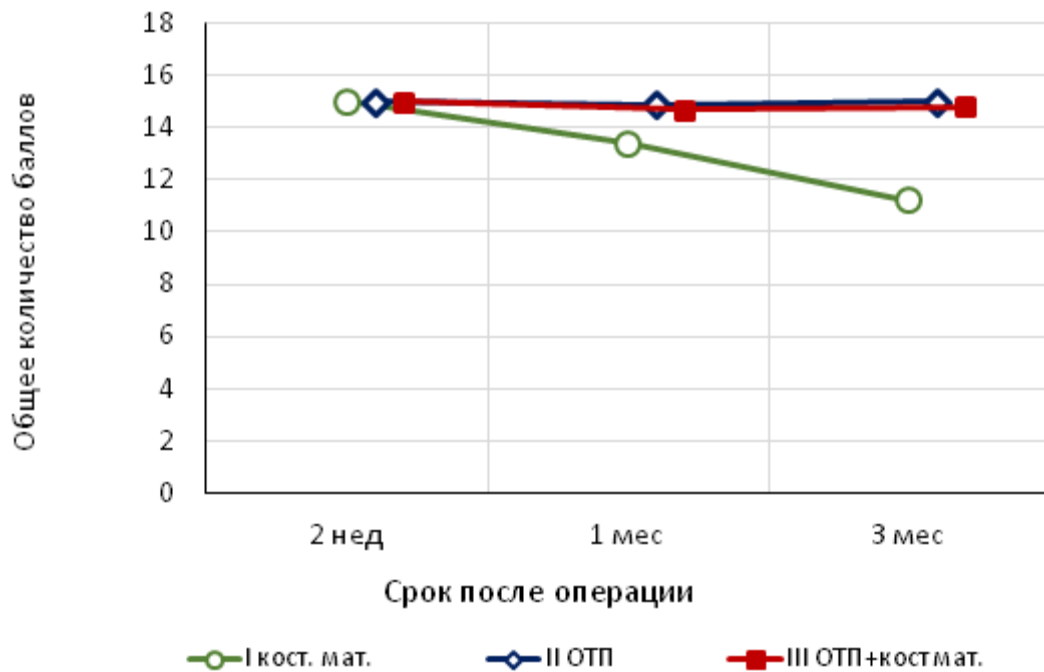


Рисунок 25 - Графики динамики выявления рентгенологических признаков остеоартроза у животных групп сравнения

Сравнительные рентгенограммы суставов животных групп сравнения, спустя 3 месяца после операции на Рисунке 26.

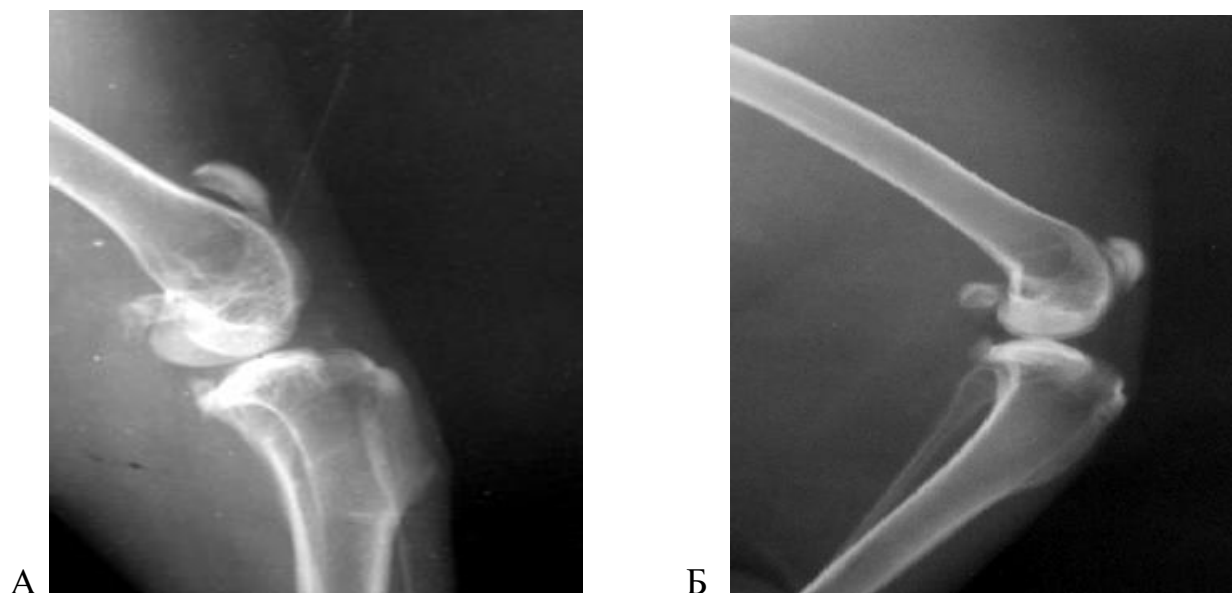


Рисунок 26 - Рентгенограммы коленных суставов кроликов в боковых проекциях, спустя 3 месяца после операции: А - пластика дефектов костным биоматериалом - видны единичные остеофиты, очаги остеосклероза, неравномерное сужение суставной щели; Б - пластика дефектов ОТП - признаки деструктивно-дистрофических процессов в суставе отсутствуют.

4.3 Сравнение результатов компьютерной томографии

С помощью нового способа оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики с помощью компьютерной томографии нами в динамике была выполнена оценка средней плотности ткани регенератов и их отдельных зон – в верхнем, среднем и нижнем уровне (патент РФ на изобретение № 2727002 от 17.07.2020). Способ позволил как охарактеризовать восполнение области дефекта визуально, так и объективно подсчитать плотность новообразованной ткани на уровне гиалинового хряща, промежуточной зоны и субхондральной кости.

Оценку качества регенератов проводили через 2 недели, 1 месяц и 3 месяца после операции. При визуальной оценке надколенниковой поверхности бедренной кости после построения 3D модели зоны интереса и виртуальной резекции надколенника в режиме Volume rendering было обнаружено, что **через 2 недели** в группах сравнения ни в одном случае формирующиеся регенераты не достигали уровня интактной суставной поверхности.

Края дефектов были узурированы, поверхность регенератов была неровной, бугристой. Однако в группах животных, которым была выполнена пластика дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой или её комбинацией с деминерализованным костным материалом у 2/3 животных дефект был практически восполнен регенератом, тогда как при монопластике деминерализованной спонгиозой регенерат заполнял лишь до 50% его объема.

У животных с пластикой дефектов ОТП через 2 недели средняя общая плотность регенератов была крайне низкой ($-168 \pm 3,3$ HU), повышаясь лишь ближе к зоне субхондральной кости, где медленно начиналась перестройка костных балок ($-87 \pm 6,7$ HU). В области в/3 и с/3 дефекта плотность новообразованного регенерата при пластике ОТП на этом сроке оставалась очень низкой (Рисунок 27).

У кроликов с монопластикой дефектов деминерализованным костным материалом и его комбинацией с ОТП средняя общая плотность новообразованных регенератов через 2 недели имела хоть и малые, но положительные значения ($26 \pm 2,2$ HU и $45 \pm 0,3$ HU) соответственно. Во многом

это было обусловлено тем, что объем дефекта, особенно в его н/3 и с/3 занимал утрамбованный биопластический костный материал, который еще не начал на данном сроке резорбироваться.

Стоит отметить значимо более высокие значения средней плотности ткани, занимающей с/3 и н/3 зоны дефекта в группе животных с комбинированной пластикой. Это, возможно, связано с противовоспалительным эффектом ОТП и стимулирующим влиянием комбинации ОТП и костного биопластического материала на раннем сроке на местные регенеративные процессы (Рисунок 28).

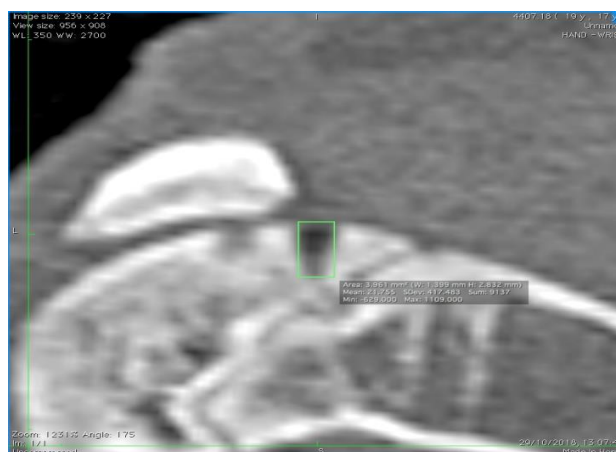


Рисунок 27 - КТ коленного сустава кролика с пластикой дефектов ОТП, спустя 2 недели в косоаксиальной проекции – выделение полигональной фигурой границ дефекта с подсчетом общей средней плотности новообразованной ткани.



Рисунок 28 - КТ коленного сустава кролика с пластикой дефектов комбинацией ОТП и костного материала, спустя 2 недели в косоаксиальной проекции – выделение окружностью зоны гталинового хряща (в/з регенерата) с подсчетом средней плотности новообразованной ткани.

Динамика изменения средней плотности ткани новообразованных регенератов и их отдельных зон после хондропластики у животных групп сравнения представлена в Таблице 11.

Таблица 11 – Динамика оценки средней плотности ткани новообразованных регенератов и их отдельных зон после хондропластики с помощью компьютерной томографии

Признак	Срок после операции	Группы животных			Статистическая значимость отличий групп		
		I (кост. мат.)	II (ОТП)	III (ОТП+ кост. мат)	pI-II	pI-III	pII-III
Плотность ткани всей площади регенерата, НУ	2 нед	26±2,2	-168±3,3	45±0,3	<0,001	<0,001	<0,001
	1 мес	83±4,6	68±7,6	111±0,3	<0,001	<0,001	<0,001
	3 мес	501±4,6	383±7,6	375±0,3	<0,001	<0,001	<0,001
Плотность ткани области в/3 регенерата, НУ	2 нед	-15±2,3	-286±5,4	5±0,3	<0,001	<0,001	<0,001
	1 мес	17±0,6	14±5,4	10±0,6	0,039	<0,001	0,004
	3 мес	387±5,4	183±5,4	178±2,3	<0,001	<0,001	0,001
Плотность ткани области с/3 регенерата, НУ	2 нед	16±5,7	-130±2,6	56±1,7	<0,001	<0,001	<0,001
	1 мес	107±5,6	81±1,4	87±0,4	<0,001	<0,001	<0,001
	3 мес	516±3,6	387±1,4	375±2,6	<0,001	<0,001	<0,001
Плотность ткани области н/3 регенерата, НУ	2 нед	38±1,1	-87±6,7	68±1,2	<0,001	<0,001	<0,001
	1 мес	120±5,6	137±1,6	237±0,6	<0,001	<0,001	<0,001
	3 мес	597±2,7	581±1,6	595±2,1	<0,001	0,027	<0,001

Уже через 1 месяц после операции в группе животных с монопластикой дефектов ОТП средняя плотность ткани новообразованного регенерата на всех уровнях имела хотя и небольшие, но положительные значения. Это свидетельствовало об активной пролиферации клеток, синтезе матрикса. Стоит отметить высокие значения средней плотности новообразованного регенерата в области субхондральной кости $120 \pm 1,6$ НУ, сравнимой с аналогичными

значениями при монопластике деминерализованным костным материалом ($137 \pm 5,6$ HU).

В группе животных, которым выполняли пластику дефектов комбинацией биопластического костного материала и ОТП, спустя 1 месяц на всех уровнях дефекта сохранялись положительные значения средней плотности новообразованной ткани (Рисунок 29).

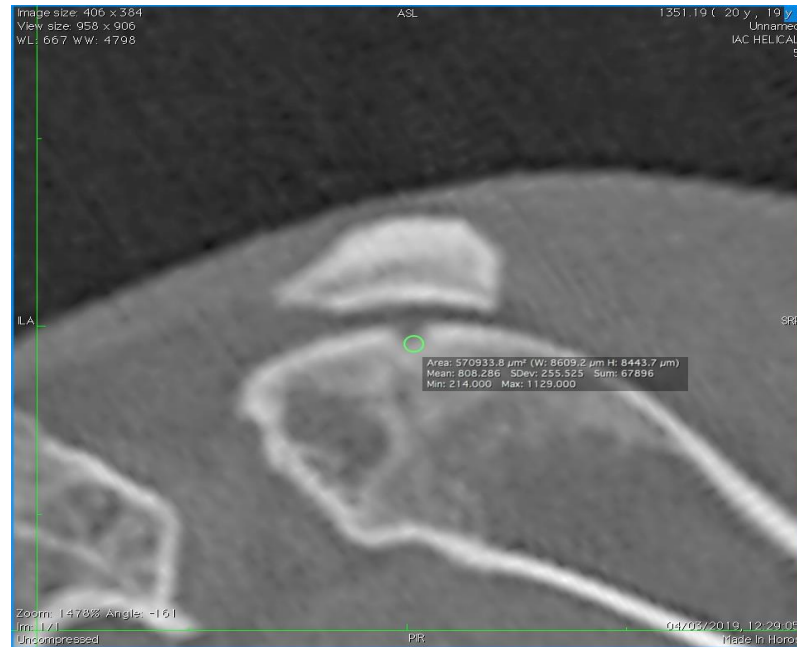


Рисунок 29 - КТ коленного сустава кролика с пластикой дефектов комбинацией ОТП и костного материала, спустя 1 месяц в косоаксиальной проекции – выделение окружностью переходной зоны между хрящом и субхондральной костью хряща с подсчетом средней плотности новообразованной ткани (в срез попал один дефект).

Максимальные средние значения плотности регенерата в этой группе были отмечены на уровне субхондральной кости ($237 \pm 0,6$ HU), что почти в 2 раза превышало аналогичные показатели в других группах сравнения. Возможно, это было связано с низкой скоростью резорбции костного биопластического материала при его совместном применении с ОТП. В то время как собственные процессы костного ремоделирования в зоне субхондральной кости активно стимулировались при таком виде хондропластики.

В то же время в группе животных с монопластикой дефектов деминерализованным костным материалом через 1 месяц после операции не наблюдали подобных скачков увеличения значений средней плотности регенерата, что было связано с активной резорбцией биоматериала в этот период. Тем не менее за счет параллельно идущих процессов костного ремоделирования в нижних зонах и пролиферации клеток ткани, заполняющей с/3 и в/3 дефекта низких значений средней плотности новообразованной ткани в этой группе не отмечали.

Через 3 месяца в группе животных, пластику дефектов у которых выполняли деминерализованным костным материалом, наблюдали следующую картину. Вследствие образования к этому времени костно-фиброзного регенерата, плотность новообразованной ткани на всех уровнях заполнения дефекта была высокой (Рисунок 30). Даже на уровне гиалинового хряща этот средний показатель соответствовал $387 \pm 5,4$ HU, тогда как в группах с монопластикой ОТП и комбинацией ОТП и биопластический материал данный показатель составлял $183 \pm 5,4$ HU и $178 \pm 2,3$ HU соответственно.

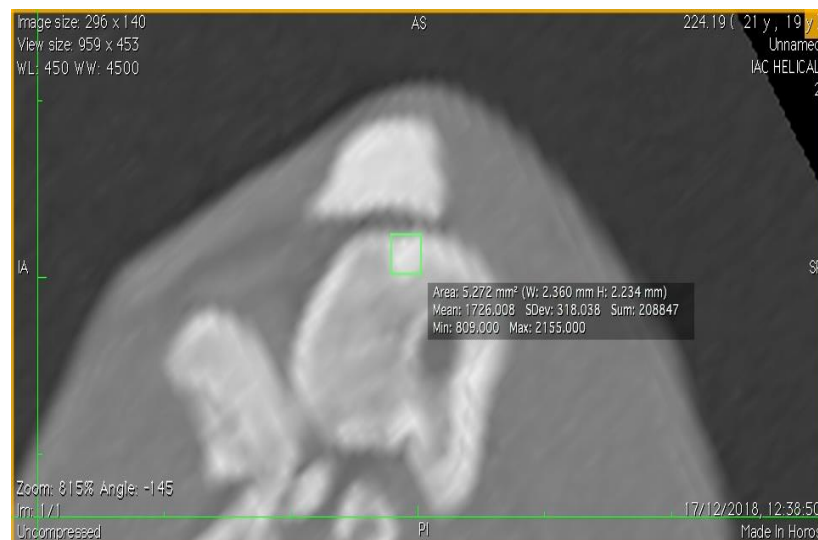


Рисунок 30 - КТ коленного сустава кролика с пластикой дефектов деминерализованным костным материалом, спустя 3 месяца в косоаксиальной проекции – выделение полигональной фигурой границ дефекта с подсчетом общей средней плотности новообразованной ткани (в срез попал один дефект).

У некоторых животных после пластики костным материалом отмечали отсутствие полноценного восполнения дефектов новообразованной тканью на уровне гиалинового хряща. Это визуализировали на КТ в виде кратерообразных углублений, свидетельствующих о малой высоте регенерата, не достигшего уровня интактной суставной поверхности (Рисунок 31). Также на срезах в проекции регенератов обнаруживали мелкие костные кисты.



Рисунок 31 - КТ коленного сустава кролика с пластикой дефектов деминерализованным костным материалом, спустя 3 месяца в косоаксиальной проекции – выделение полигональной фигурой границ дефекта с подсчетом общей средней плотности новообразованной ткани (в срез попал один дефект).

В группах кроликов, у которых осуществляли пластику дефектов ОТП, либо с помощью её комбинации с деминерализованным костным материалом через 3 месяца наблюдали восполнение всего объема дефектов новообразованными регенератами. В трех случаях наблюдали эффект «+ ткань», когда регенераты возвышались над зоной интактного хряща.

В целом у животных этих групп средние показатели плотностей зон регенератов к 3 месяцу становились сравнимыми с аналогичными показателями

интактных зон. Патологической перестройки в регенератах у этой группы животных не наблюдали (Рисунок 32).

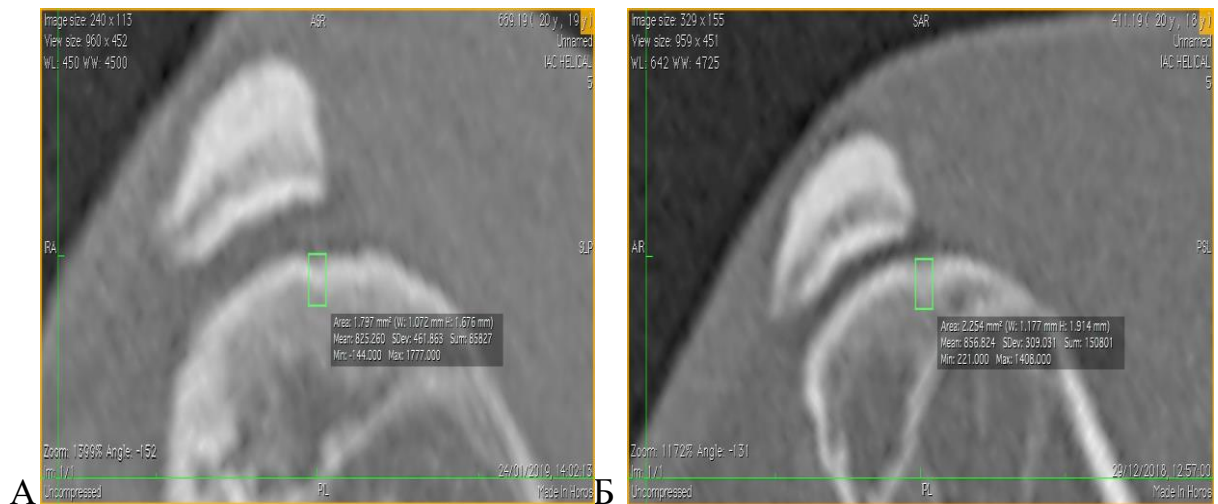


Рисунок 32 - КТ коленных суставов кроликов с пластикой, спустя 3 месяца в косоаксиальной проекции – выделение полигональными фигурами границ дефектов с подсчетом общей средней плотности новообразованной ткани: А – пластика комбинацией ОТП и костного материала; Б – монопластика ОТП.

Динамика изменения общей средней плотности ткани новообразованных регенератов у животных групп сравнения показана на Рисунке 33.

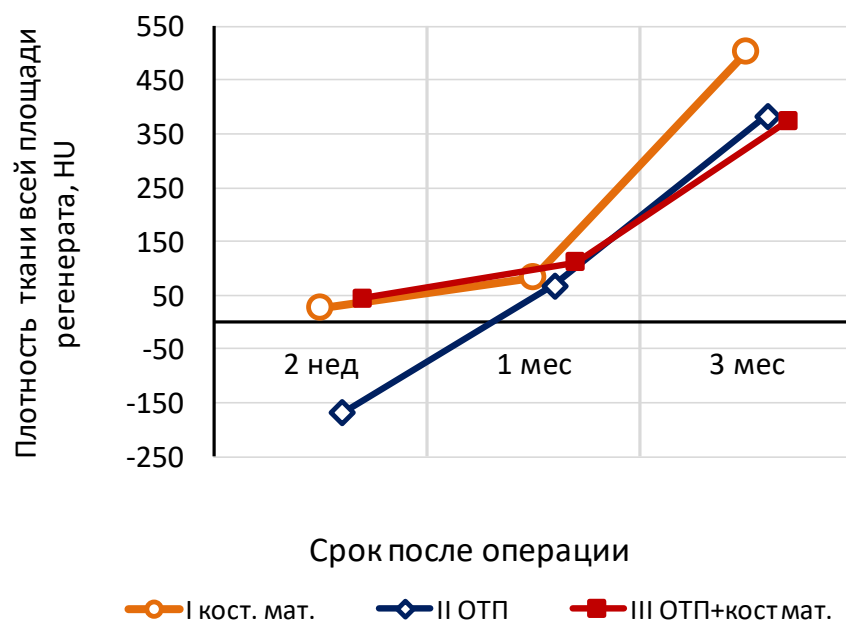


Рисунок 33 - Динамика изменения общей средней плотности ткани новообразованных регенератов у животных групп сравнения

Таким образом, примененный нами новый способ оценки новообразованных регенератов после хондропластики может быть успешно применен в доклинических исследованиях у животных в качестве прижизненной оценки качества формирующихся регенератов в динамике и прогнозирования эффективности хондропластики.

4.4. Оценка макропрепаратов коленных суставов

При выводе животных из эксперимента осуществляли макроскопическую оценку состояния коленных суставов животных групп сравнения по балльной шкале S. O' Driscoll et al. Непосредственный осмотр материалов аутопсии позволял оценить как общие деструктивно-дистрофические изменения в суставах, так и проанализировать состояние области пластики и новообразованных регенератов. Анализ полученных данных в том числе позволял подтвердить результаты прижизненно выполненных кроликам инструментальных исследований – рентенографии и компьютерной томографии коленных суставов.

Результаты оценки макроскопической картины коленных суставов у кроликов групп сравнения представлены в Таблице 12 и на Рисунке 34.

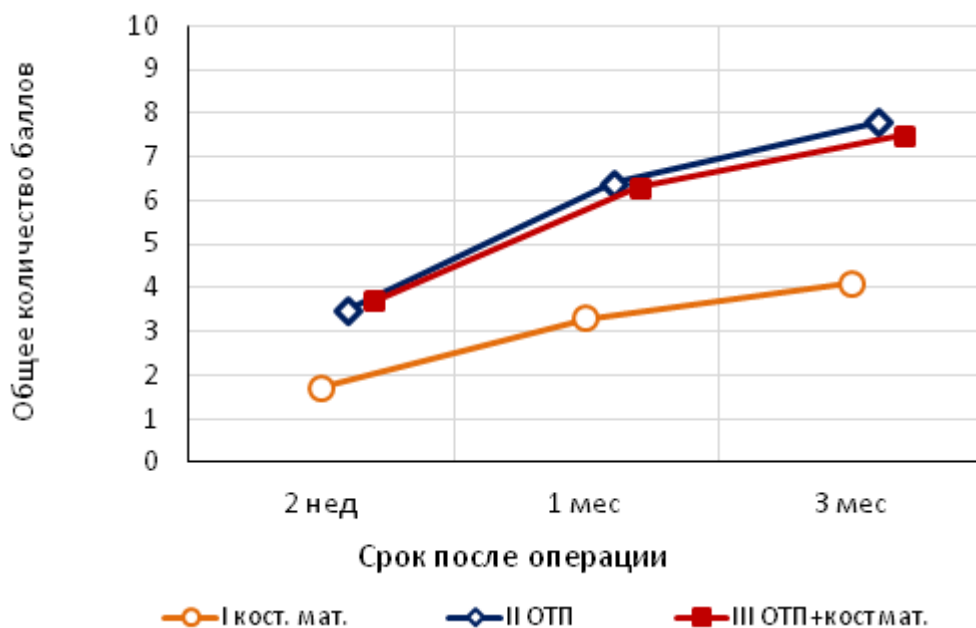


Рисунок 34 – Динамика изменения показателей макроскопической картины коленных суставов у кроликов групп сравнения

Таблица 12 – Динамика изменений показателей макроскопической оценки коленного сустава по S. O' Driscoll et al. в послеоперационном периоде (в баллах)

Критерии	Нор-ма	Срок после операции	Группы животных			Статистическая значимость отличий групп		
			I (кост. мат.)	II (ОТП)	III (ОТП+кост. мат)	pI-II	pI-III	pII-III
Амплитуда движений в суставе	2	2 нед	0,2±0,1	0,5±0,2	0,5±0,2	<0,001	<0,001	1,000
		1 мес	1,5±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		3 мес	1,8±0,2	1,9±0,2	1,9±0,2	0,314	0,314	1,000
Восстановление контура суставной поверхности	2	2 нед	0,1±0,2	0,6±0,2	0,8±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
		1 мес	0,2±0,1	1,2±0,1	1,5±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
		3 мес	0,9±0,2	1,9±0,1	1,8±0,2	<0,001	<0,001	0,126
Внутрисуставной спаечный процесс	2	2 нед	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,2	1,000	1,000	1,000
		1 мес	0,7±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		3 мес	0,5±0,1	1,6±0,1	1,5±0,1	<0,001	<0,001	0,006
Эрозии суставной поверхности	2	2 нед	0,4±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		1 мес	0,6±0,2	1,3±0,1	1,1±0,2	<0,001	<0,001	<0,001
		3 мес	0,5±0,2	1,5±0,1	1,4±0,1	<0,001	<0,001	0,006
Внешний вид регенерата	2	2 нед	0,2±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		1 мес	0,3±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	<0,001	<0,001	1,000
		3 мес	0,4±0,1	0,9±0,2	0,9±0,1	<0,001	<0,001	1,000
Общее количество баллов	10	2 нед	1,7±0,2	3,5±0,1	3,7±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
		1 мес	3,3±0,2	6,4±0,1	6,3±0,1	<0,001	<0,001	0,006
		3 мес	4,1±0,1	7,8±0,1	7,5±0,1	<0,001	<0,001	<0,001

Пример макроскопической картины надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли монопластику деминерализованным костным материалом, показан на Рисунке 35.



Рисунок 35 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли монопластику деминерализованным костным материалом через 2 недели после операции.

В целом на ранних сроках в этой группе не отмечали развития деструктивно-дистрофических процессов – не было, спаек, деформации суставной поверхности. Интактный гиалиновый хрящ был белесовато-голубого цвета, блестящий без эрозий. Области пластики дефектов визуально были легко обнаружить.

Дефекты были заполнены ниже уровня интактной суставной поверхности тканью желтоватого цвета. Поверхность новообразованной ткани была неоднородной, шероховатой, непрозрачной. При нажатии на регенераты они были упругими, не отслаивались и были рыхло связаны с материнским ложем дефекта.

Через 1 месяц наблюдений картина при монопластике костным материалом была несколько иной. У 50% животных обнаруживали начальные признаки деструктивно-дистрофических изменений, которые проявлялись в изменении цвета гиалинового хряща – он становился тусклым, сероватым, появлялись области деформации суставной поверхности. При этом глубоких эрозий не было. Отмечали избыточное образование жировой ткани в периартикулярных тканях.

Области дефектов при визуальном осмотре по-прежнему хорошо определялись. Стоит отметить, что ткань новообразованных регенератов также не

достигала уровня неповрежденной суставной поверхности. При этом поверхность самих регенератов на этом сроке наблюдения становилась гладкой. При надавливании была очень плотной и была прочно связана с ложем дефектов (Рисунок 36).



Рисунок 36 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли монопластику деминерализованным костным материалом через 1 месяц после операции.

Через 3 месяца наблюдений в коленных суставах этой группы животных начинали развиваться деструктивно-дистрофические процессы – отмечали деформацию надколенниковой поверхности бедренной кости, которая имела тусклый серо-бурый цвет. В ряде суставов отмечали наличие эрозий суставной поверхности.

Область дефектов была, как правило, отличима от суставной поверхности за счет недостаточного восполнения объёма дефектов. Но регенераты имели сходный с интактной суставной поверхностью цвет и плотность при надавливании инструментом. При этом часто отмечали деформацию интактного гиалинового хряща вблизи новообразованных регенератов (Рисунок 37).

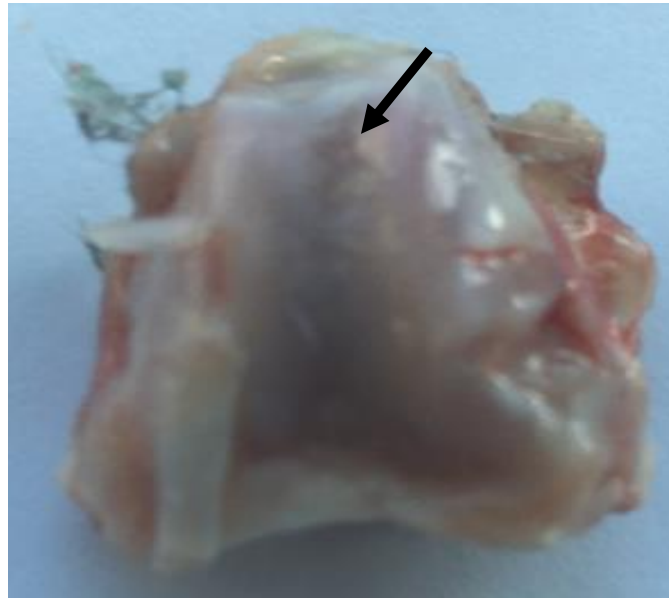


Рисунок 37 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли монопластику деминерализованным костным материалом через 3 месяца после операции (стрелкой указана звездчатая деформация суставной поверхности вблизи новообразованного регенерата)

Через 2 недели после операции, в группе животных, которым осуществляли монопластику дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой, не отмечали деструктивно-дистрофических процессов в суставе. Надколенниковая поверхность бедренной кости была блестящей, гладкой. Деформаций и эрозий гиалинового хряща не наблюдали.

Дефекты хорошо визуализировались и были заполнены прозрачным регенератом светло-желтого цвета, не достигающим до уровня интактной суставной поверхности. Поверхность регенератов была гладкой. При нажатии инструментом регенераты были упругими, плотно прилегали к лолам дефектов (Рисунок 38).

На этом же сроке в группе кроликов, которым выполняли комбинированную пластику дефектов ОТП и деминерализованным костным материалом также не отмечали патологических изменений в суставе. Дефекты хорошо визуализировали на надколенниковой поверхности бедренной кости. Они были заполнены неоднородными регенератами серо-желтого цвета. Объемы дефектов

они полностью не восполняли. При надавливании инструментов были упруги, плотно связаны с ложами дефектов (Рисунок 39).



Рисунок 38 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли монопластику обогащенной тромбоцитами плазмой через 2 недели после операции.

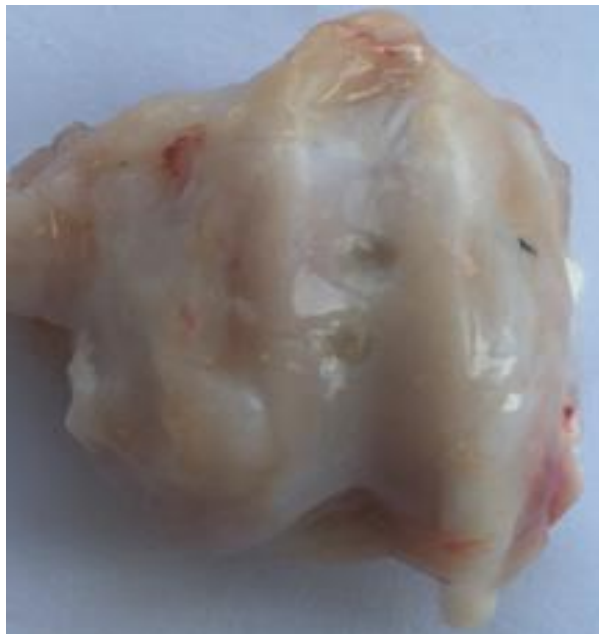


Рисунок 39 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли комбинированную пластику обогащенной тромбоцитами плазмой и деминерализованным костным материалом через 2 недели после операции.

Через 1 месяц в группах животных с выполнением монопластики костно-хрящевых дефектов ОТП выделялись регенераты, начинающие внешне походить на окружающий суставной хрящ. Однако их отличал серо-розовый оттенок и матовость. Регенераты практически полностью заполняли дефекты, однако не доходили до уровня интактной суставной поверхности.

Сращение между краями регенератов и интактной суставной поверхностью было достаточно выражено. При надавливании тупым инструментом регенераты были плотно фиксированы к материнским лолам дефектов и по твердости приближались к окружающему гиалиновому хрящу.

Деструктивно-дистрофических процессов в коленных суставах кроликов этой группы не наблюдали – суставная надколенниковая поверхность бедренной кости не имела эрозий, деформаций, была гладкой и блестящей (Рисунок 40).

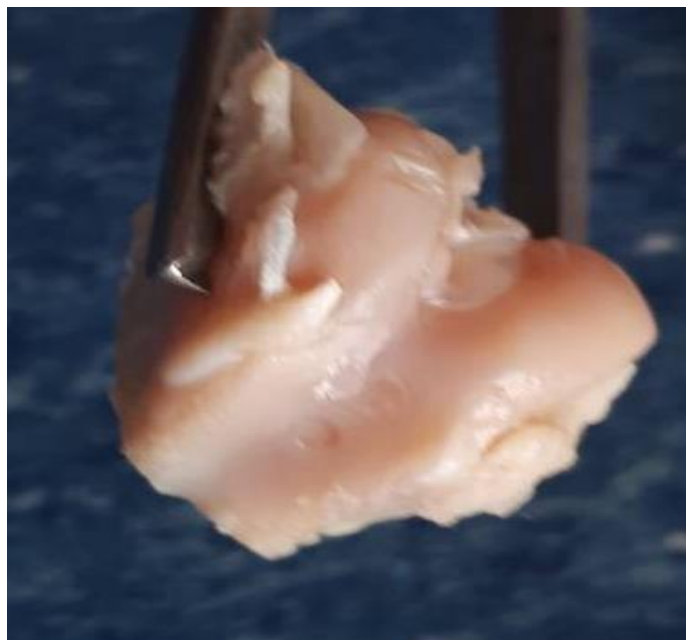


Рисунок 40 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли монопластику обогащенной тромбоцитами плазмой через 1 месяц после операции.

В эти же сроки у животных после выполнения комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов ОТП и деминерализованным костным материалом также отмечали замещение дефектов тканью внешне напоминающей интактный гиалиновый хрящ. (Рисунок 41).



Рисунок 41 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости в группе животных, которым выполняли комбинированную пластику ОТП и костным материалом через 1 месяц после операции.

Поверхность регенератов была гладкой, но не блестящей, а более тусклой. Уровень новообразованных регенератов всё же не достигал суставной поверхности. В коленных суставах кроликов этой группы также не отмечали развития деструктивно-дистрофических процессов

Спустя **3 месяца** при осмотре макропрепаратов животных с выполнением как монопластики костно-хрящевых дефектов ОТП, так и при комбинированной пластике костно-хрящевых дефектов ОТП и деминерализованным костным материалом область пластики дефектов суставного гиалинового хряща была практически не отличима от прилежащей надколенниковой поверхности бедренной кости.

Отмечали плотное сращение ткани регенератов с окружающим интактным гиалиновым хрящом. Поверхность регенератов была ровной, блестящей. Признаков деструктивных изменений коленных суставов в обеих группах сравнения животных не было (Рисунок 42 А,Б).

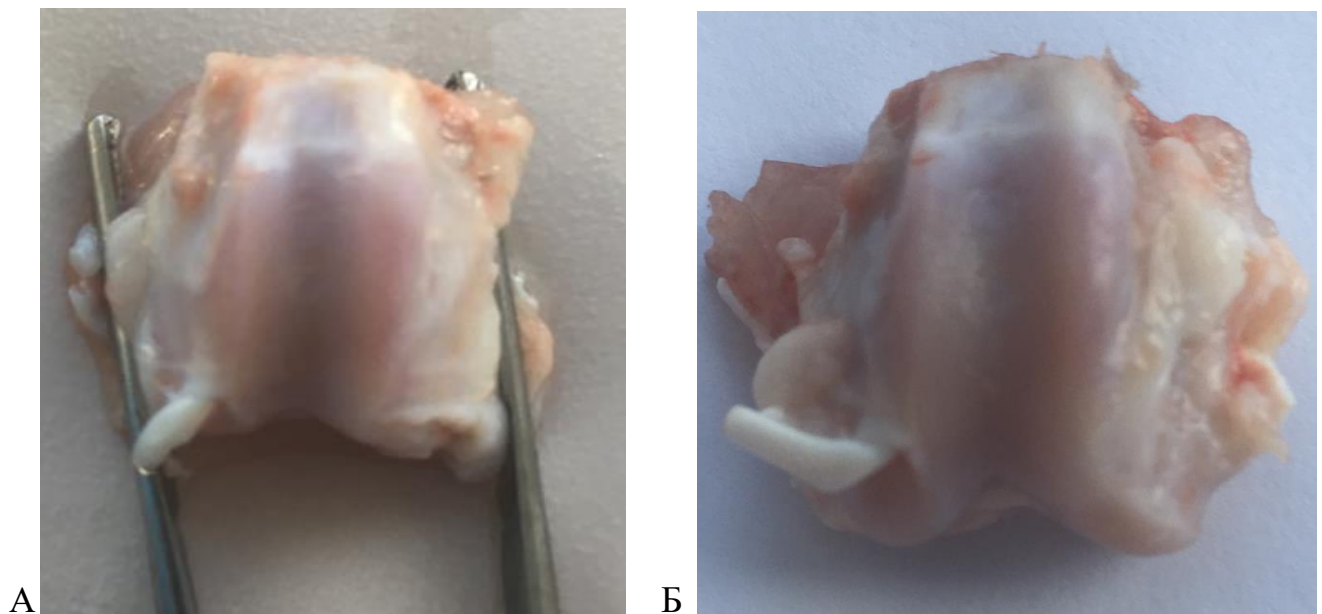


Рисунок 42 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости через 3 месяца после операции: А - после монопластики ОТП; Б – после комбинированной пластики ОТП и деминерализованным костным материалом.

В группе животных после комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов ОТП и деминерализованным костным материалом область в двух случаях через 3 месяца наблюдали эффект «плюс ткани» регенерата, когда он выстоял над интактной суставной поверхностью и травмировал противоположную дисконгруэнтную с ним суставную поверхность (Рисунок 43).



Рисунок 43 - Макроскопическая картина эффекта «плюс ткани» регенерата, спустя 3 месяца после комбинированной пластики ОТП и костным материалом

В группе животных после монопластики дефектов ОТП в одном случае наблюдали изменения со стороны интактного суставного гиалинового хряща надколенниковой поверхности бедренной кости, который становился серым и тусклым с участком эрозий. При этом область пластики дефектов была неизменена – поверхность новообразованных регенератов была гладкой, блестящей, прозрачной, бело-голубого цвета (Рисунок 44).



Рисунок 44 - Макроскопическая картина надколенниковой поверхности бедренной кости через 3 месяца после монопластики ОТП: видны новообразованные регенераты с гладкой блестящей поверхностью бело-голубого цвета на фоне измененного интактного гиалинового хряща (одно наблюдение)

Таким образом, на основании оценки макроскопической картины коленных суставов животных после выполнения разных видов пластики можно сказать следующее. Замещение дефектов деминерализованным костным материалом по окончании наблюдения позволяло заполнить их объем, однако качество регенератов не соответствовало интактному суставному хрящу, что проявлялось в прогрессирующей деформации вблизи области пластики. В коленных суставах таких животных развивались деструктивно-дистрофические процессы. В то время как в группах животных с монопластикой дефектов ОТП и комбинированной пластикой костно-хрящевых дефектов ОТП и деминерализованным костным

материалом на поздних сроках дефекты восполнялись полностью гиалиноподобной тканью, в ряде случаев не отличимой от интактного суставного хряща. При этом структурно-функциональное состояние коленных суставов у этих групп животных на позднем сроке наблюдения не страдало, развития деструктивно-дистрофических процессов у них не отмечали.

4.5. Анализ результатов микроскопического исследования

При оценке качества новообразованных регенератов после пластики дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости в динамике применяли морфологическую шкалу оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланиным с соавторами (2004).

Результаты пластики костно-хрящевых дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости деминерализованным костным материалом

Через 2 недели отмечали неравномерное заполнение новообразованными регенератами дефектов. В зоне в/3 дефектов новообразованная ткань подчас отсутствовала, либо была представлена скудными участками фиброзной ткани, не заполняющими объем зоны в/3 дефектов. В целом новообразованные регенераты были рыхло связаны с материнскими ложами дефектов – в с/3 отмечали диастазы между ними. В н/3 дефектов новообразованные регенераты были связаны с подлежащими тканями более плотно. Общий вид дефекта представлен на Рисунке 45.

В с/3 и н/3 объем дефектов заполняла новообразованная соединительная ткань с полиморфным клеточным составом, формирующейся сосудистой сетью. Среди этой ткани располагались фрагменты деминерализованного костного материала в виде неравномерной длины и толщины участков губчатой костной ткани. Начиналась активная резорбция пластического материала. В нижних участках дефектов наблюдали слабую остеобластическую реакцию (Рисунок 46).

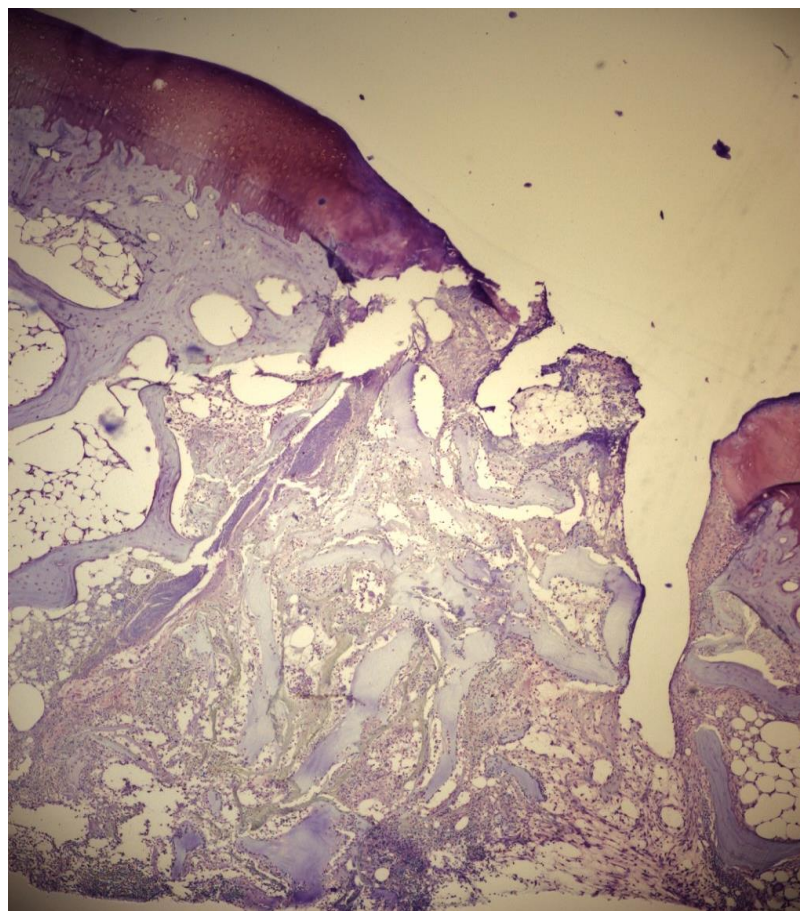
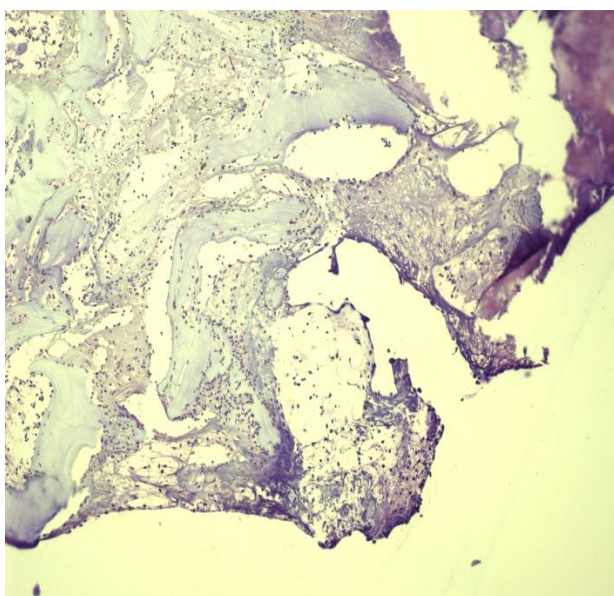
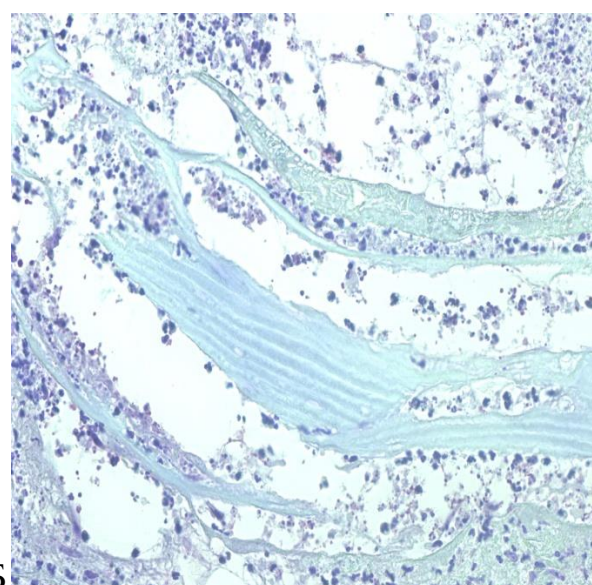


Рисунок 45 – Формирующийся регенерат в области дефекта через 2 недели после его пластики деминерализованным костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.



А



Б

Рисунок 46 – Фрагменты костного материала в составе регенерата через 2 недели после пластики. Окраска – крезильовый фиолетовый. А -Увеличение 100; Б –увеличение 400.

На Рисунке 47 представлен срез края регенерата на периферии дефекта. Хорошо видно значительное разобщение формирующегося регенерата и материнского ложа дефекта. При этом нужно отметить, что по периферии ткань регенерата подчас достигала уровня нижних отделов интактного суставного гиалинового хряща. Также обращает на себя внимание полоса плотно расположенных клеток по верхнему краю регенерата, часто соприкасающаяся с гиалиновым хрящом – проявление краевой регенерации.

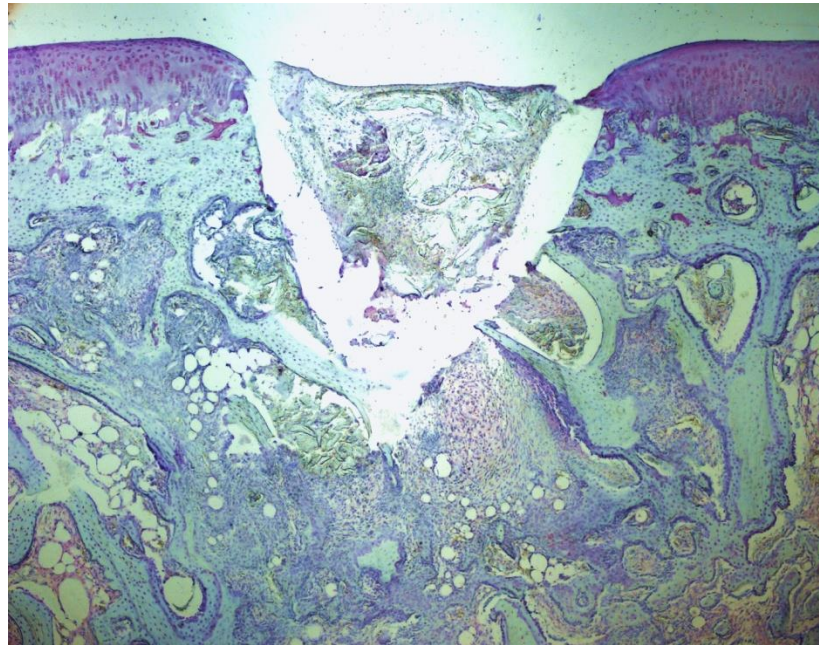


Рисунок 47 – Край регенерата на периферии дефекта через 2 недели после его пластики деминерализованным костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

Следует отметить, что на этом сроке соседний интактный суставной гиалиновый хрящ был не изменен, за исключением некоторых краевых участков, травмированных при формировании дефектов зубо-врачебным буром. Сохранялась зональность гиалинового хряща, типичное расположение и тип клеток. Деструктивно-дистрофических процессов не наблюдали.

Через 1 месяц после операции в группе животных, которым выполняли монопластику деминерализованным костным материалом на периферии отмечали практически полное восполнение объема дефектов. Однако в центре ткань регенерата западала и не достигала уровня интактной суставной поверхности. На

этом сроке ткань регенерата плотно прилегала к материнскому ложу дефекта. Небольшие диастазы отмечали лишь в в/3 регенератов на уровне интактного суставного гиалинового хряща. На этом уровне регенерат был представлен рыхлой соединительной тканью с большим количеством мелких фибробластов, формирующейся сосудистой сетью. Общий вид регенерата представлен на Рисунке 48.

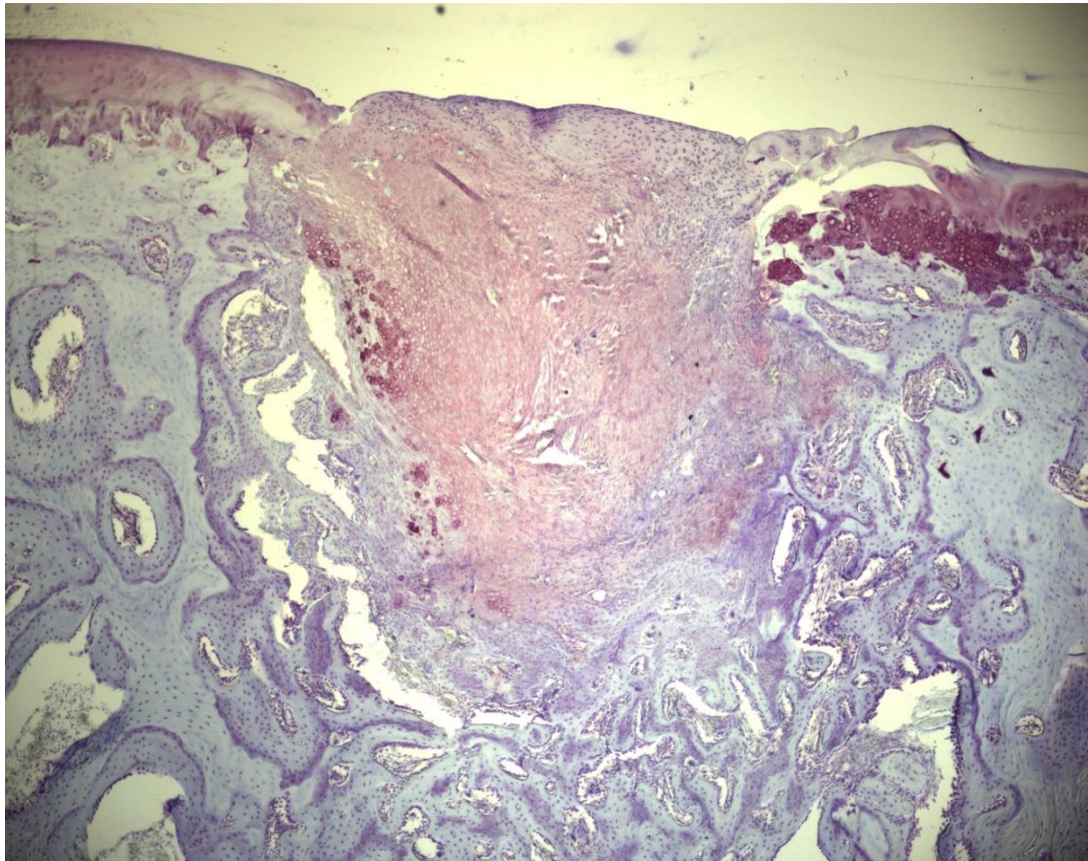


Рисунок 48 – Формирующийся регенерат ближе к периферии дефекта через 1 месяц после его пластики деминерализованным костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

На этом сроке завершался лизис фрагментов деминерализованного костного материала, который «обгонял» репаративные процессы. Поэтому в с/3 регенератов нередко наблюдали пустоты, окруженные плотной фиброзной тканью. В нижних участках дефекта в области субхондральной кости отмечали активные регенераторные процессы – выраженную остеобластическую реакцию,

формирование новой костной ткани. По периферии дефекта новообразование и ремоделирование костной ткани происходило и в вышерасположенных зонах регенерата – в его средней трети (Рисунок 49А).

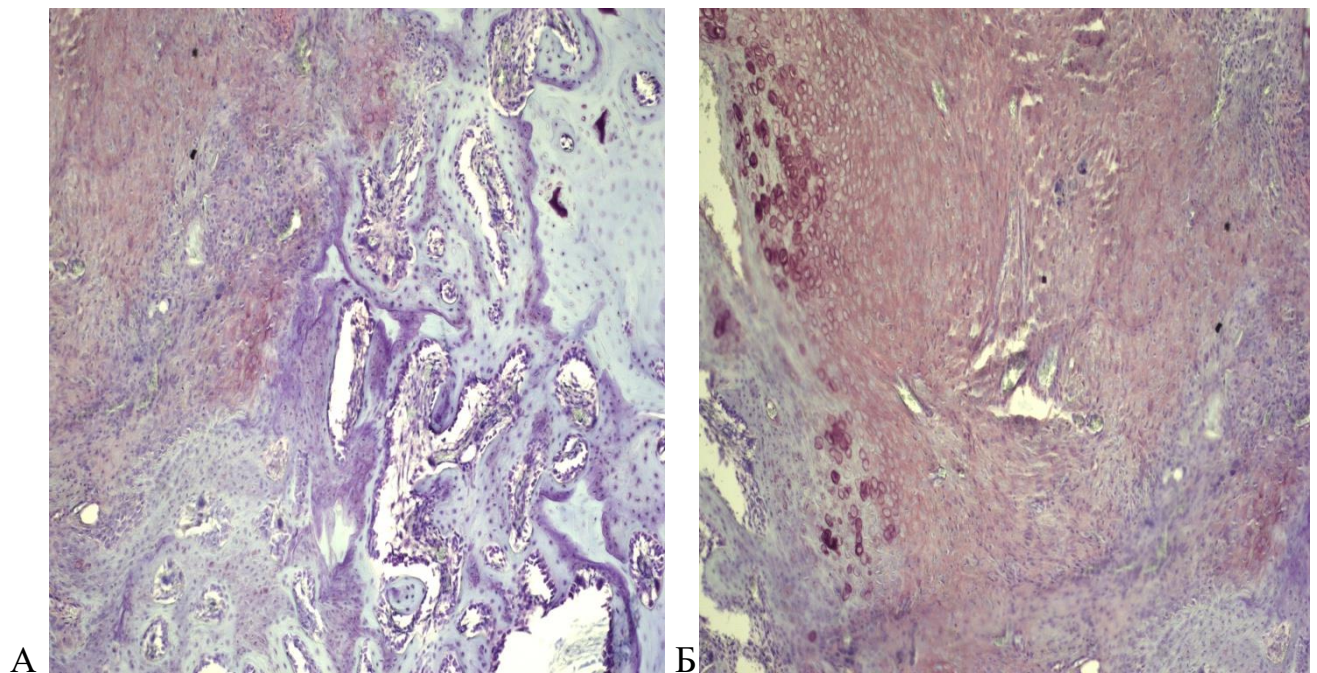


Рисунок 49 – Формирующийся регенерат через 1 месяц после его пластики костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100: А – активная остеобластическая реакция на уровне с/3 дефекта; Б – полиморфное клеточное скопление в центре регенерата с

Центральную часть регенератов отличал полиморфный клеточный состав. Преобладающими клетками были плотно расположенные фибробласты. Ближе к материнскому ложу дефекта, зонам с активной остеобластической реакцией в с/3 зоны регенерата обнаруживали скопления хрящевых клеток – происходило постепенное ремоделирование и новообразование костной ткани в этой зоне через хрящевую модель. В этой зоне обнаруживали большое количество сформированных сосудов. (Рисунок 49Б).

Переходная зона между регенератом и интактным суставным гиалиновым хрящом представлена на Рисунке 50. Обращает на себя внимание наличие в верхних отделах регенерата волокнистой фиброзной ткани, богатой сосудами. По поверхности регенерата вновь проходит тонкая полоска плоских вытянутых

клеток. Стоит отметить прогрессирование деструктивно-дистрофических процессов в суставном гиалиновом хряще – как в прилежащем к дефекту, так и в гиалиновом хряще, расположенном далеко от него. Нарушалась зональность хрящевой ткани, отмечали вакуольную дистрофию хондроцитов, снижение количества изогенных групп хрящевых клеток.

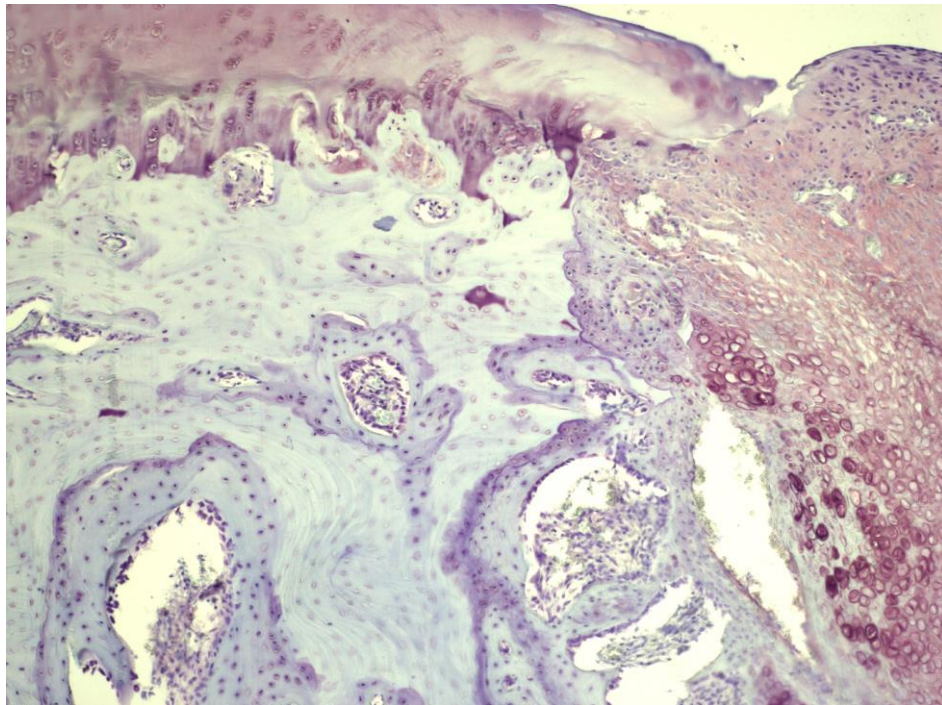


Рисунок 50 – Пограничная зона интактного суставного гиалинового хряща и новообразованного регенерата через 1 месяц после пластики костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100: отмечаются деструктивно-дистрофические изменения в прилежащем гиалиновом хряще

Через 3 месяца отмечали заполнение тканью регенерата всего объема дефекта. Однако в прилежащем гиалиновом хряще прогрессировали деструктивные процессы – появлялись трещины, эрозии на периферии зоны пластики, исчезновение зональности строения хрящевой ткани, обеднение её клеточными элементами. В самом регенерате отмечали формирование костной ткани на уровне, соответствующем интактному суставному хрящу – то есть процесс новообразования костной ткани не ограничивался субхондральной костью и распространялся к поверхности регенерата (Рисунки 51,52).

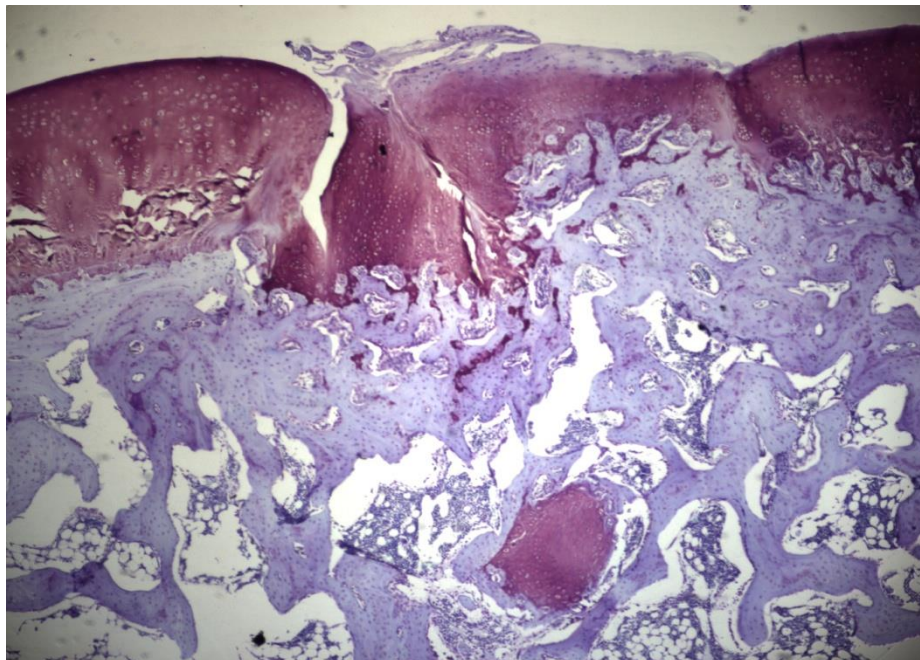


Рисунок 51 – Сформированный регенерат через 3 месяца после пластики дефекта деминерализованным костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

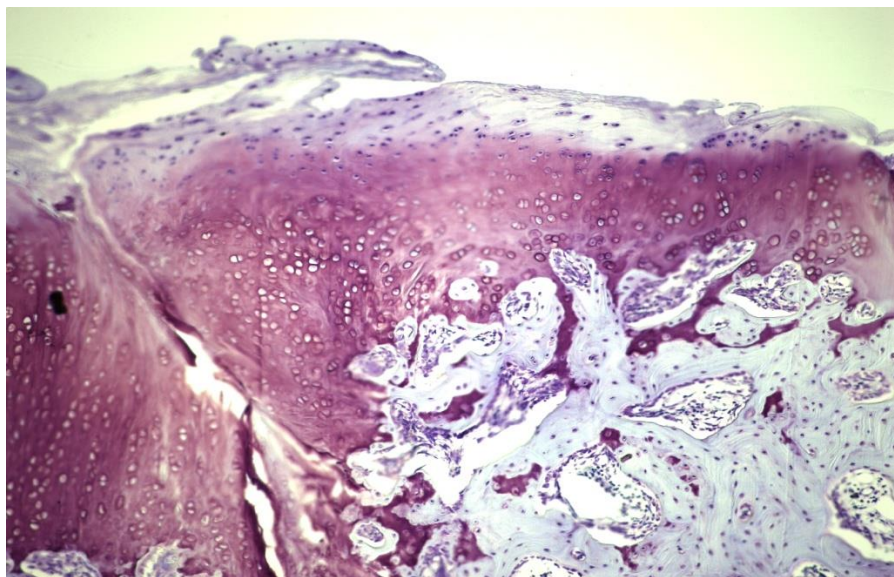


Рисунок 52. Костно-фиброзный регенерат с участками гиалиноподобной ткани на уровне интактного гиалинового хряща через 3 месяца после пластики дефекта костным материалом. Видна область глубокой деструкции в пограничной зоне, разрастание волокнистой соединительной ткани в поверхностной зоне регенерата. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100.

На рисунке 52 хорошо отражена поверхностная зона сформированного регенерата. Несмотря на наличие участков гиалиноподобной ткани поверхность

регенерата на этом сроке вновь представлена волокнистой соединительной тканью, причем волокна деформированы, деструктивно изменены, надорваны. Среди участков гиалиноподобной ткани обнаруживаются сосуды, что позволяет предположить в дальнейшем ремоделирование этой ткани в костно-фиброзную. Хорошо виден глубокий щелевидный дефект на границе регенерата.

Таким образом, при пластике дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости у кроликов деминерализованным костным материалом к 3 месяцу наблюдений не произошло восстановления суставного гиалинового хряща. Область дефекта заместила костно-фиброзный регенерат, еще находящийся в процессе ремоделирования. При этом как в ближайшем к зоне пластики, так и отдаленном суставном гиалиновом хряще начали прогрессировать деструктивно-дистрофические процессы.

Результаты пластики костно-хрящевых дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП)

Через 2 недели после пластики отмечали полиморфную картину в разных отделах регенератов. Область дефектов была выполнена тканью, представленной большим количеством мелких пролиферирующих фибробластоподобных клеток, преимущественно в глубоких зонах регенерата. В подлежащей дефекту костной ткани уже на том сроке наблюдали активную остеобластическую реакцию.

В верхних слоях регенерата количество клеток уменьшалось, между ними отмечали ярко окрашенные участки матрикса. Поверхность регенерата не доходила до уровня интактного суставного хряща, особенно в центре. Тем не менее хорошо видна связь верхней части регенерата и подлежащего гиалинового хряща – они плавно переходят друг в друга, поверхность их гладкая.

Наряду с этим отмечали наличие диастаза между тканью регенерата и материнским ложем дефекта. Регенерат рыхло прилегал к окружающим тканям. Деструктивно-дистрофических изменений в подлежащем гиалиновом хряще не наблюдали. При этом поверхность (Рисунки 53,54).

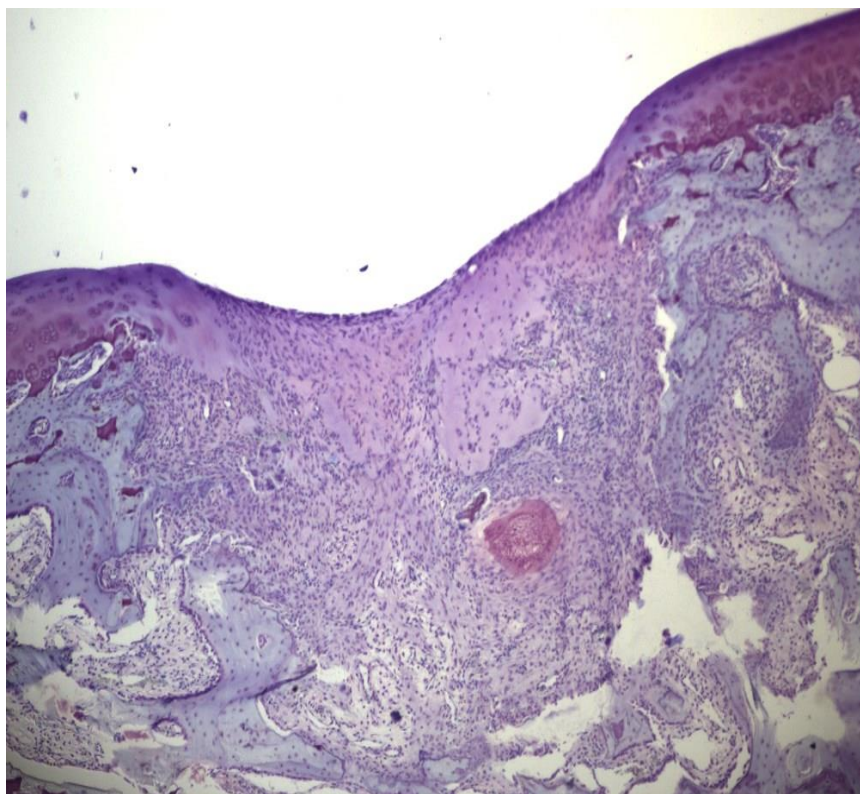


Рисунок 53 – Формирующийся регенерат (срез по центру) в области дефекта через 2 недели после его пластики ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

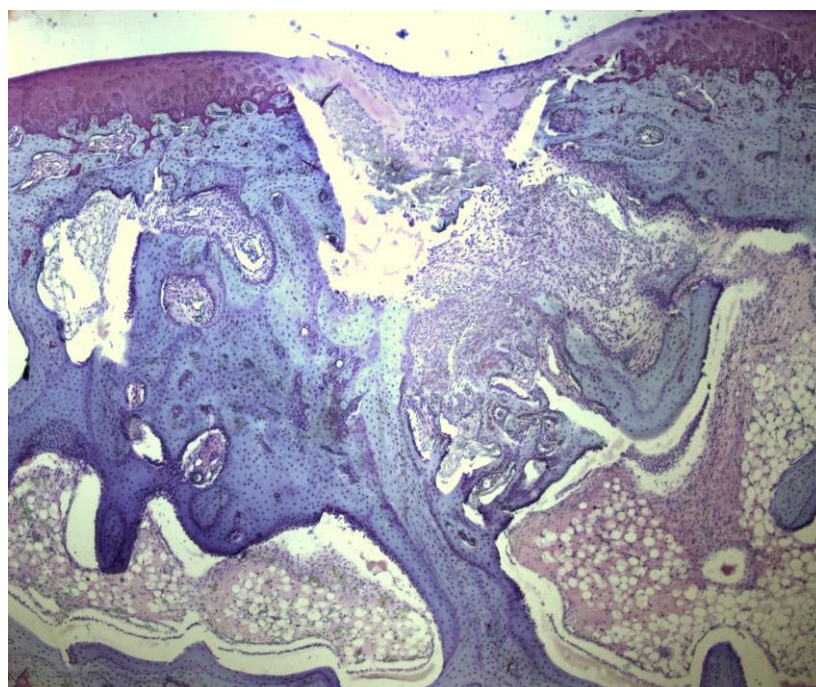


Рисунок 54 – Формирующийся регенерат (срез по периферии) в области дефекта через 2 недели после его пластики ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

На Рисунке 44 показан срез регенерата на периферии – хорошо заметны диастазы между регенератом и прилежащим ложем дефекта. Виден дефект заполнения объема области пластики в зоне с/3 регенерата. При этом сохраняется достаточно прочная связь с краями прилежащего суставного гиалинового хряща – поверхность регенерата покрыта полоской плоских удлиненных клеток, которые «наплывают» на регенерат со стороны интактного гиалинового хряща – проявление краевой регенерации

Через 1 месяц после выполнения пластики костно-хрящевых дефектов ОТП наблюдали полное заполнение объёма повреждения новообразованной тканью. При этом поверхность регенерата плавно переходила в прилежащий гиалиновый хрящ. Тем не менее, на этом сроке снова отмечали диастаз области с/3 регенерата и ложа дефекта, при том, что с гиалиновым хрящом и подлежащей субхондральной костью регенерат был плотно связан (Рисунок 55).

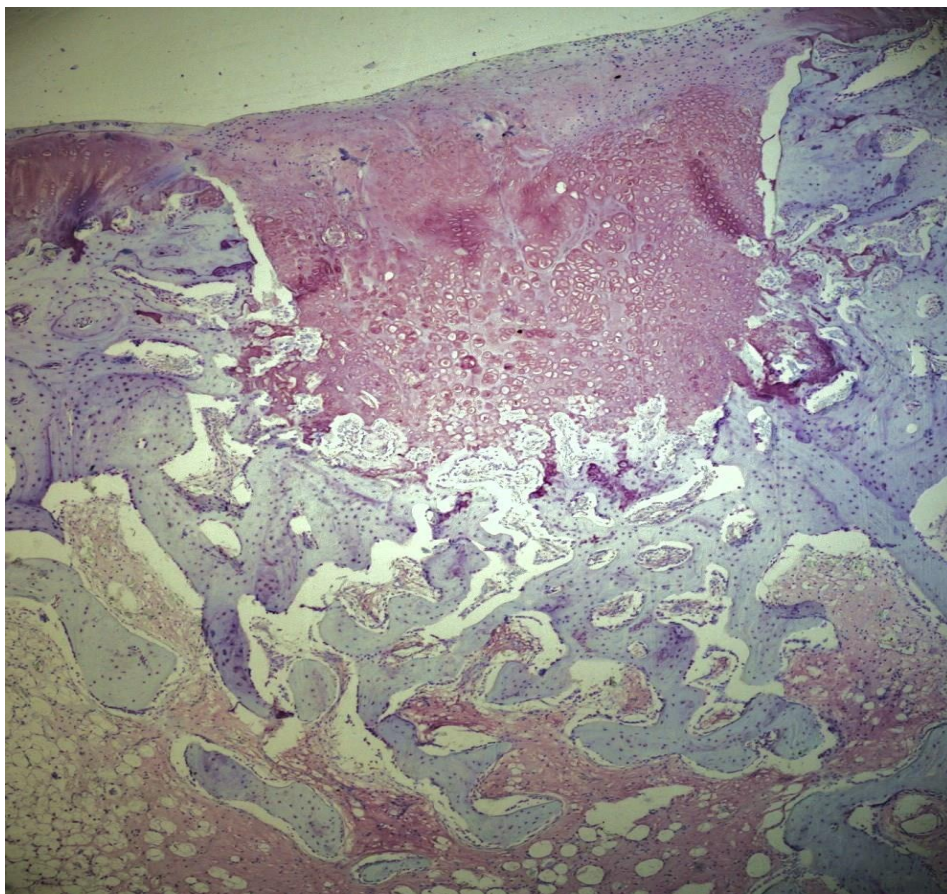


Рисунок 55 – Формирующийся регенерат (срез по центру) в области дефекта через 1 месяц после его пластики ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

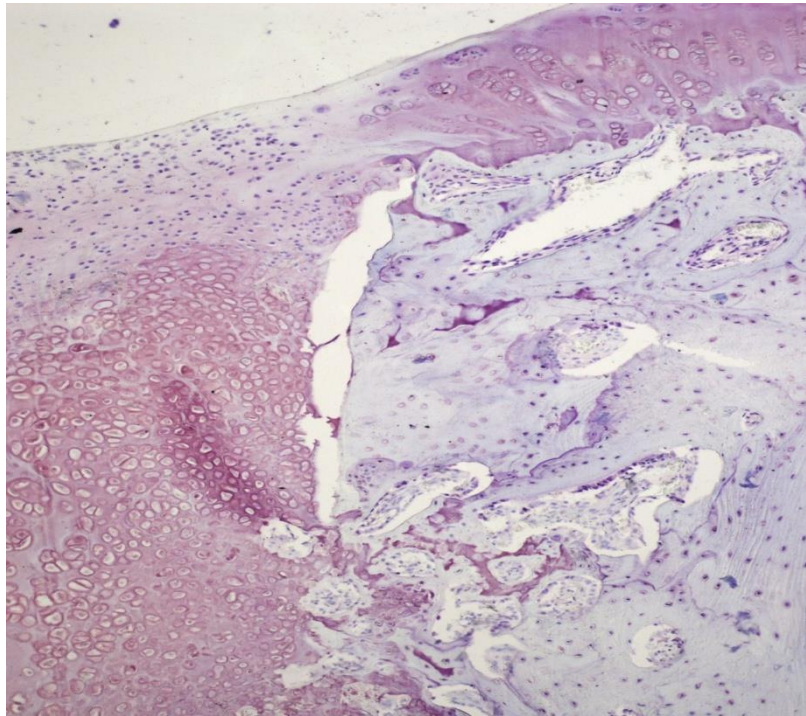


Рисунок 56 – Пограничная зона интактного суставного гиалинового хряща и новообразованного регенерата через 1 месяц после пластики ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100.

На Рисунке 56 хорошо просматривается связь новообразованного регенерата с прилежащим суставным гиалиновым хрящом. Необходимо отметить, что в отличие от группы животных, пластику дефектов которым выполняли деминерализованным костным материалом, деструктивно-дистрофических изменений в структуре гиалинового хряща в данной группе не было – хрящ сохранял свою зональность, толщину.

В с/3 регенерата отмечали большое количество крупных хондроподобных клеток, лежащих среди ярко окрашенного матрикса. Часть из них начинала организовываться в группы, напоминающие изогенные. Клетки активно пролиферировали – обнаруживали много фигур митозов. Характерно, что в отличие от группы животных, пластику дефектов которым выполняли деминерализованным костным материалом, кровеносных сосудов в этой зоне регенерата не наблюдали. В нижних отделах регенерата отмечали продолжающуюся активную остеобластическую реакцию с формированием новой костной ткани (Рисунок 57).

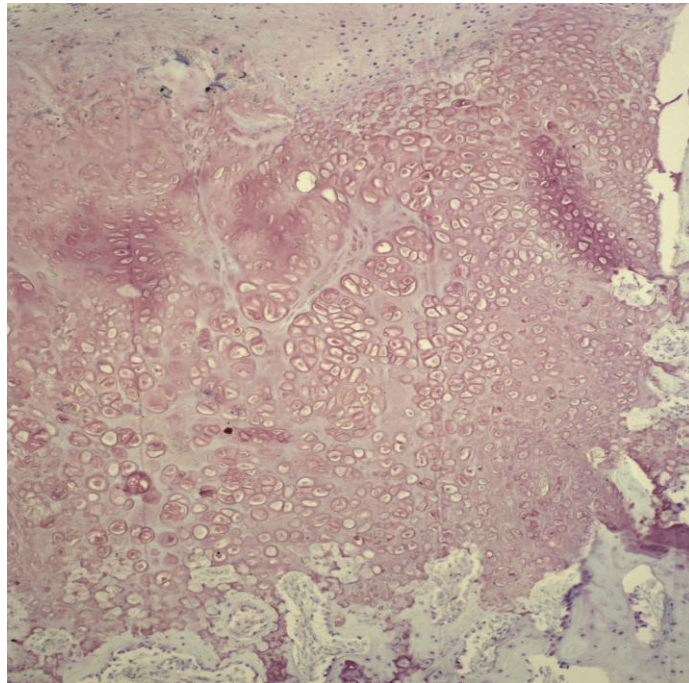


Рисунок 57 – Центральная зона новообразованного регенерата через 1 месяц после пластики ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100. Видны многочисленные пролиферирующие хондроподобные клетки. Osteобластическая реакция в глубоком слое регенерата.

Через 3 месяца после монопластики дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости ОТП отмечали полное восстановление их объёма тканью регенератов. Поверхность регенератов плавно переходила в подлежащий суставной гиалиновый хрящ. Никаких признаков деструктивно-дистрофического поражения прилежащего суставного хряща не было. Более того – к этому сроку регенераты практически гистотопически восстанавливали область повреждения. Центральная часть регенерата была представлена гиалиновой хрящевой тканью с классической зональностью, наличием изогенных групп клеток, столбиков хондроцитов, разделением на слои обызвествленного и необызвествленного хряща.

В субхондральной кости к этому сроку завершались процессы костного ремоделирования – уровень новообразованной костной ткани совпадал с уровнем расположения интактной субхондральной кости. Поверхностный участок

регенерата был неоднороден – он был представлен группами мелких пролиферирующих фибробластоподобных и хрящевых клеток (Рисунки 58,59).

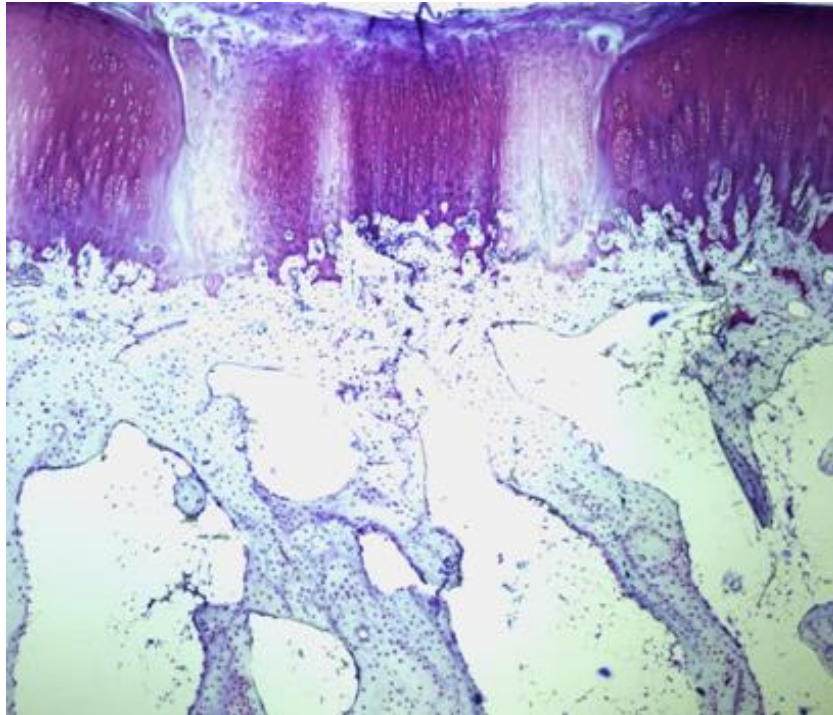


Рисунок 58 – Сформированный регенерат (срез по центру) через 3 месяца после пластики дефекта ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

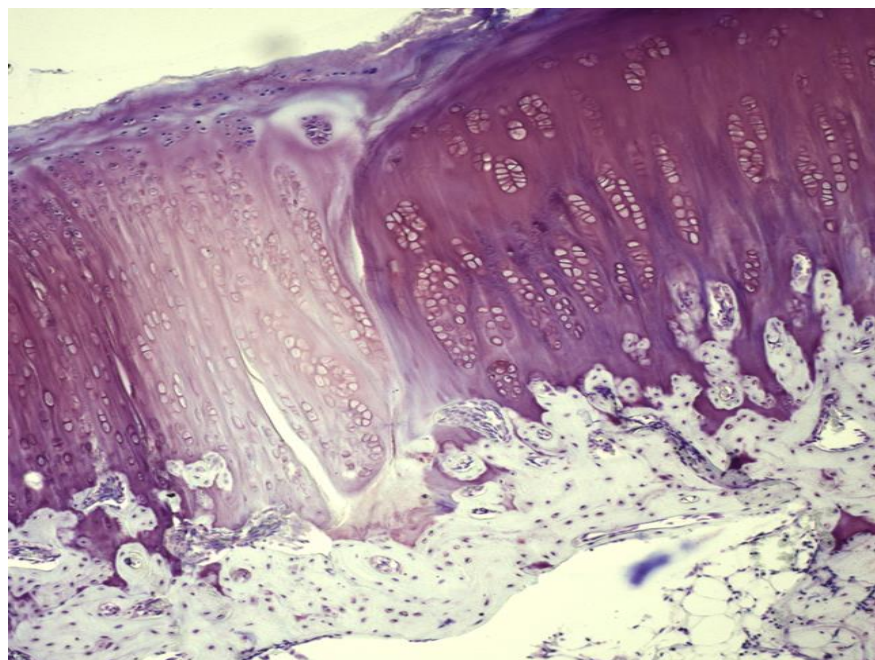


Рисунок 59 – Пограничная зона интактного суставного гиалинового хряща и новообразованного регенерата через 3 месяца после пластики ОТП. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100.

Результаты комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП) и деминерализованным костным материалом

Через 2 недели после пластики отмечали следующую картину. Между формирующимся регенератом и материнским ложем дефекта был значительный диастаз – особенно по периферии. При этом в глубоких отделах дефекта ткань регенерата располагалась более плотно. Весь объем регенерата был представлен фрагментами деминерализованного костного пластического материала. Интересно, что уже на этом сроке они уже активно подвергались лизису – на материале были заметны активные остеокласты. Между элементами костного материала визуализировали формирующуюся рыхлую соединительную ткань.

(Рисунок 60).

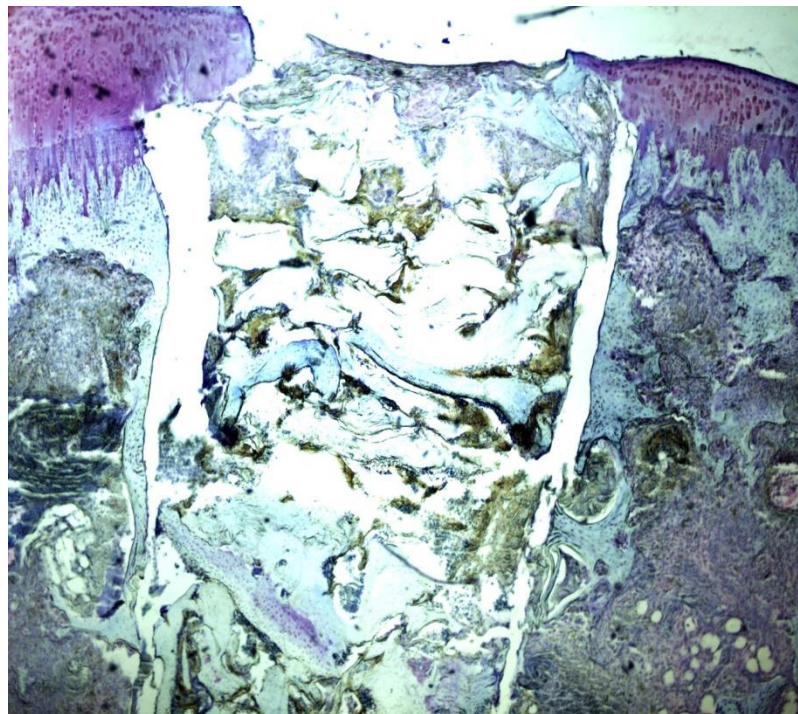


Рисунок 60 – Формирующийся регенерат (срез по центру) в области дефекта через 2 недели после его комбинированной пластики ОТП и костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

Поверхностная зона регенерата уже на этом сроке была представлена оформленной рыхлой волокнистой соединительной тканью с полоской плоских вытянутых клеток, наползающих на поверхность регенерата со стороны интактного суставного хряща (Рисунок 51).

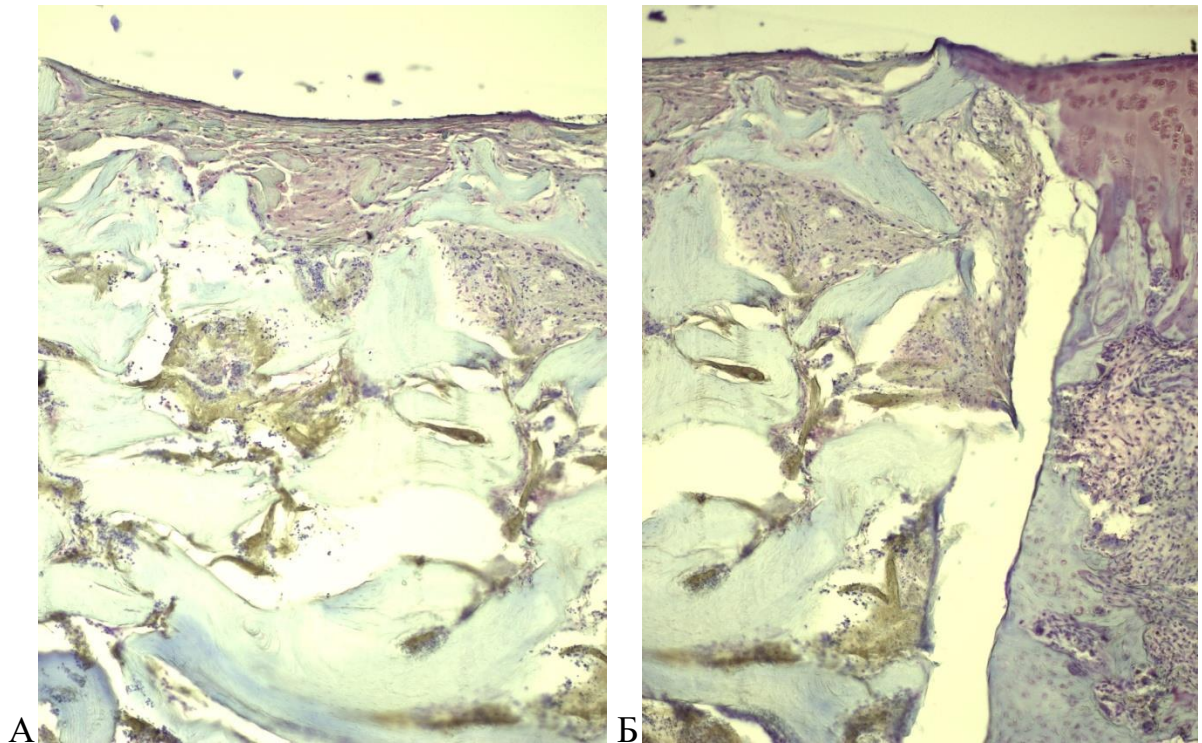


Рисунок 61 – Регенерат области дефекта через 2 недели после его комбинированной пластики ОТП и костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100: А – поверхностный уасок регенерата; Б - Пограничная зона интактного суставного гиалинового хряща и новообразованного регенерата.

Через 1 месяц после выполнения комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов ОТП и костным материалом наблюдали полное заполнение объёма повреждений новообразованной тканью. При этом поверхность регенерата плавно переходила в прилежащий гиалиновый хрящ. Регенераты плотно прилегали к ломам материнских дефектов на всех уровнях, диастазов между ними не было, в отличие от результатов монопластики ОТП на этом же сроке. Деструктивно-дистрофических изменений подлежащего гиалинового хряща также не отмечали – хрящ сохранял свою зональность, толщину.

В с/3 регенерата отмечали большое количество крупных хондроподобных клеток, лежащих среди ярко окрашенного матрикса. Часть из них начинала организовываться в группы, напоминающие изогенные. Клетки активно пролиферировали – обнаруживали много фигур митозов. Кровеносных сосудов в

этой зоне регенерата не наблюдали. В нижних отделах регенерата отмечали продолжающуюся активную остеобластическую реакцию с формированием новой костной ткани (Рисунок 62).

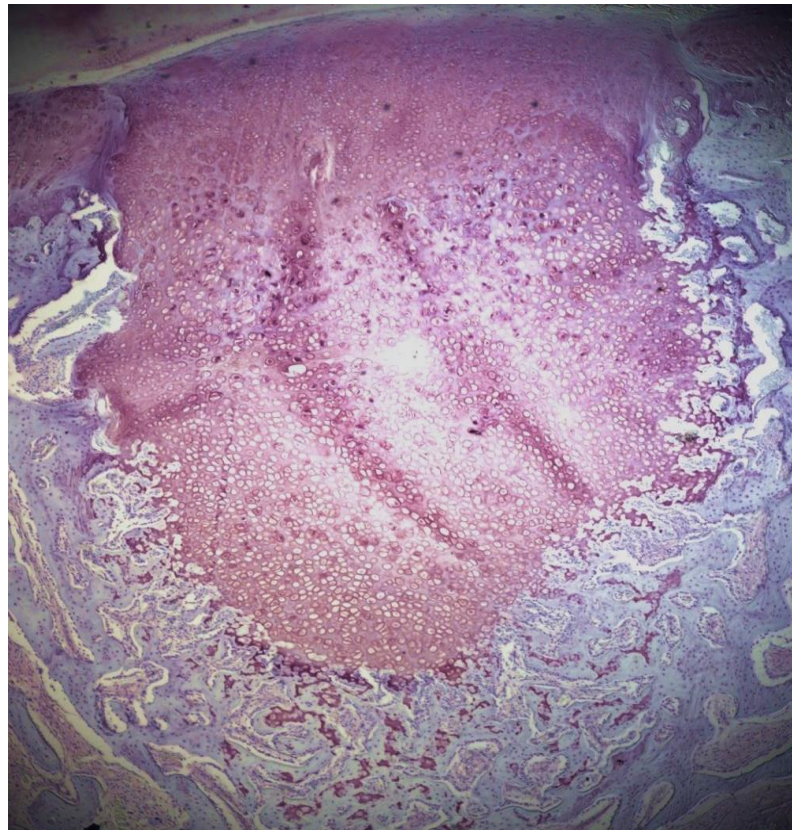


Рисунок 62 – Формирующийся регенерат (срез по периферии) в области дефекта через 1 месяц после его комбинированной пластики ОТП и костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

При выполнении среза микропрепаратов через центральный отдел регенерата было обнаружено следующее – в центре регенерата на этом сроке сохранялись фрагменты деминерализованного костного пластического материала. Он подвергался лизису, о чем свидетельствовали участки пустоты вокруг таких фрагментов и наличие активных остеокластов вблизи них. Оставшийся костный материал окружали пролиферирующие хрящеподобные клетки. Отмечали активную остеобластическую реакцию не только у основания регенерата, но и в его средней трети. Поверхностный слой регенерата на таких срезах был представлен скоплением мелкоклеточных элементов. Наблюдали характерную полоску плоских клеток, напластывающуюся на регенерат со стороны гиалинового хряща (Рисунки 63,64).

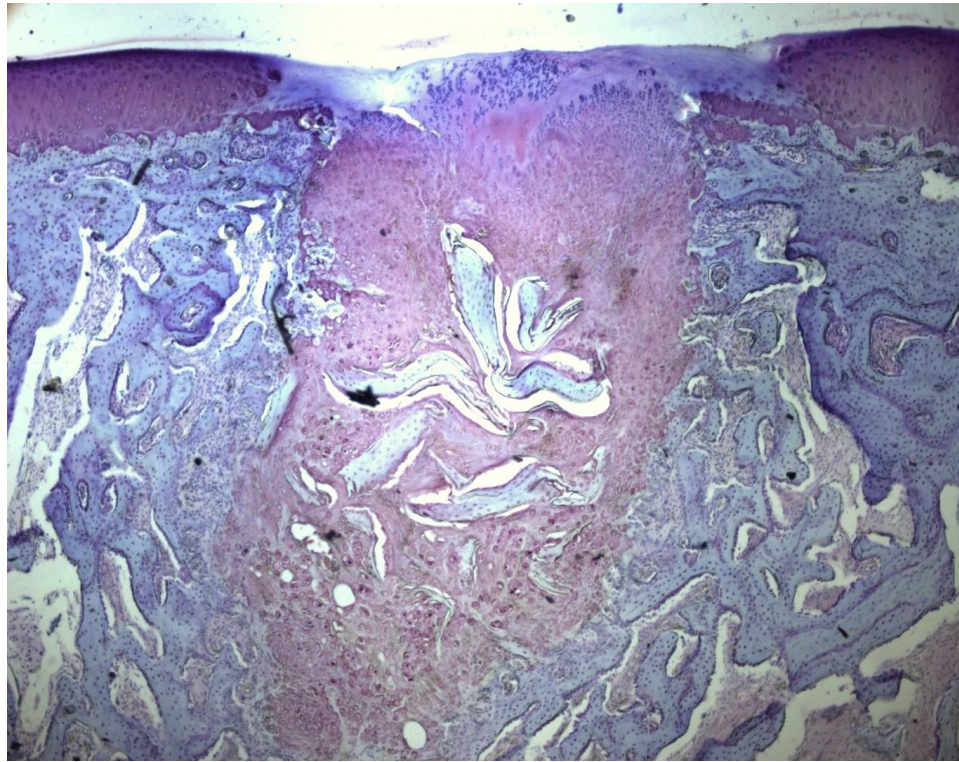


Рисунок 63 – Формирующийся регенерат (срез по центру) через 1 месяц после комбинированной пластики ОТП и костным материалом – в центре регенерата видны его фрагменты. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 40.

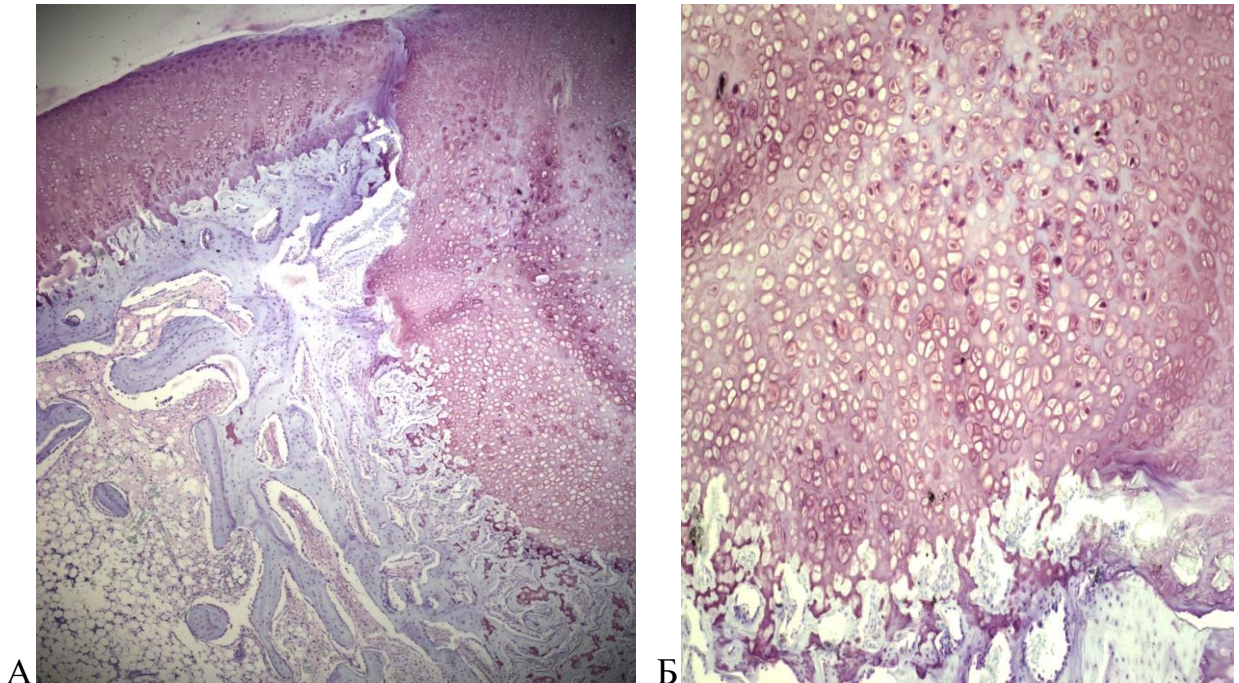


Рисунок 64 -Регенерат через 1 месяц после комбинированной пластики дефекта ОТП и костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100: А-Пограничная зона интактного суставного гиалинового хряща и регенерата; Б – многочисленные хрящевые клетки в центральных отделах регенерата.

Через 3 месяца после комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов ОТП и костным материалом отмечали полное восстановление их объёма тканью регенератов. Поверхность регенератов плавно переходила в подлежащий суставной гиалиновый хрящ. Никаких признаков деструктивно-дистрофического поражения прилежащего суставного хряща не было. Более того – к этому сроку регенераты практически гистотопически восстанавливали область повреждения (Рисунок 65).

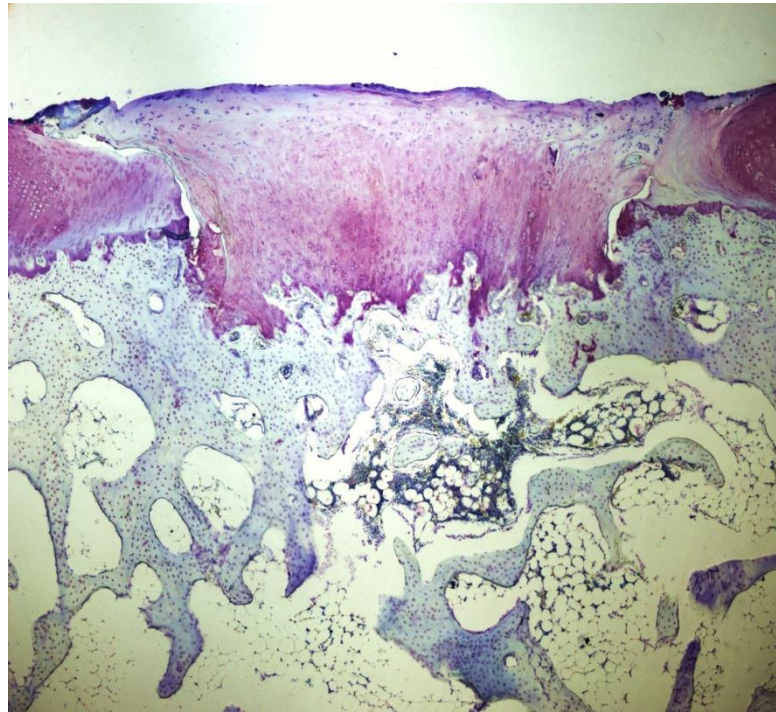


Рисунок 65 – Сформированный регенерат (срез по центру) через 3 месяца после комбинированной пластики дефекта ОТП и костным материалом. Окраска – крезиловый фиолетовый. Увеличение 40.

Центральная часть регенерата была представлена гиалиновой хрящевой тканью с классической зональностью, наличием изогенных групп клеток, столбиков хондроцитов, разделением на слои обызвествленного и необызвествленного хряща. Однако гиалиновая хрящевая ткань заполняла дефект избыточно - даже ниже уровня интактной субхондральной кости – возможно, это было связано с продолжающимся рнмоделированием субхондральной кости через хрящевую модель остеогенеза.

Поверхностный участок регенерата был представлен группами мелких пролиферирующих фибробластоподобных и хрящевых клеток. Поверхностный

слой плоских и вытянутых клеток регенераты плавно переходил в подлежащий гиалиновый хрящ.

На Рисунке 66 показаны пограничные зоны новообразованного регенерата и интактного гиалинового хряща. Следует сказать, что в отличие от группы животных, которым выполняли монопластику дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой, у кроликов этой группы переходные зоны редко восстанавливались. Сохранялась гиалиноподобная ткань в месте перехода ткани регенерата в хрящ (Рисунок 66 А). Либо ткань регенерата наслаивалась на поверхность интактного гиалинового хряща (Рисунок 66 Б).

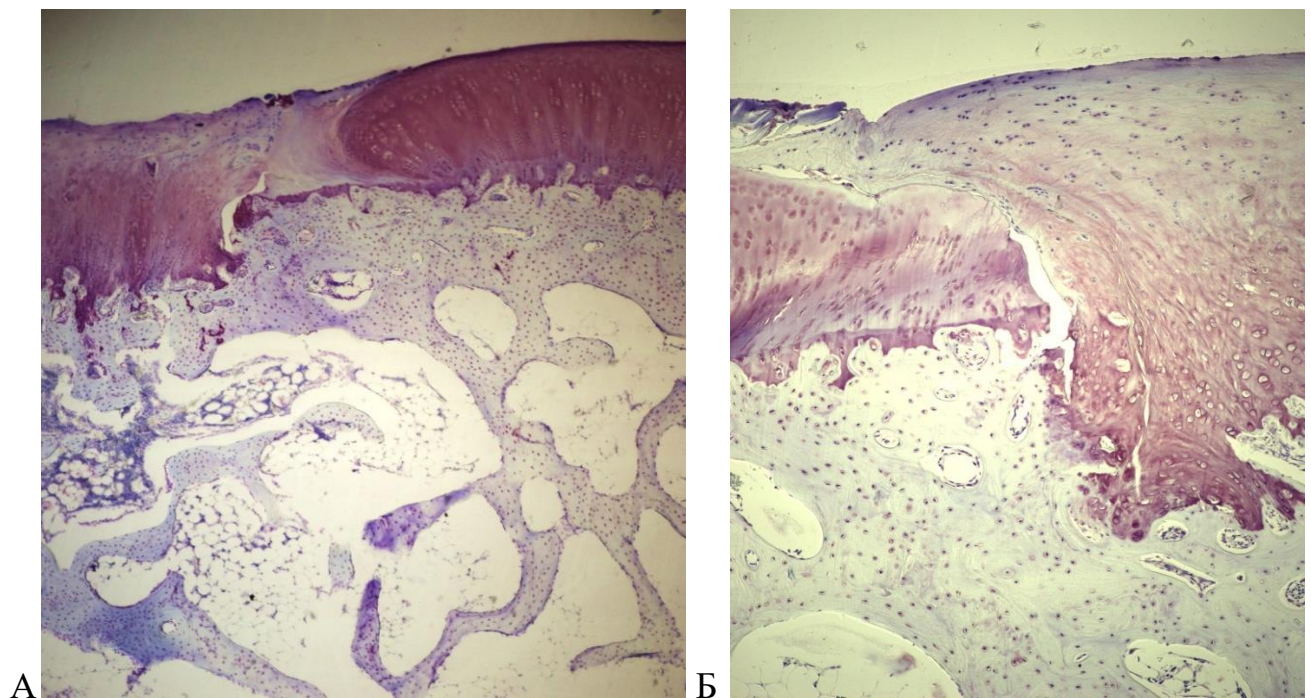


Рисунок 66 – Пограничные зоны интактного суставного гиалинового хряща и новообразованного регенерата через 3 месяца после комбинированной пластики дефекта ОТП и костным материалом. Окраска – крезильовый фиолетовый. Увеличение 100.

Сравнение результатов динамики изменения показателей по морфологической шкале оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавторами представлена в Таблицах 13, 14 и 15 – на соответствующих сроках наолюдения.

Таблица 13 – Динамика изменения показателей по морфологической шкале оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавторами на сроке 2 недели после операции

Показатель	Норма	Клинические группы, 2 недели после операции			Сравнение групп друг с другом		
		I кост. мат.	II ОТП	III ОТП+кост мат.	pI-II	pI-III	pII-III
Клеточный состав ткани в области дефекта	20	5,4±0,2	8,4±0,2	7,3±1,2	<0,001	<0,001	<0,001
Степень заполнения дефекта	20	11,2±1,3	13,2±1,3	14,4±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Структура поверхностных слоев дефекта	10	0,2±0,1	1,2±0,1	1,7±0,3	<0,001	<0,001	<0,001
Структура глубоких слоев дефекта	10	0,2±0,1	2,2±0,1	2,7±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Окрашивание матрикса	5	2,1±0,3	2,1±0,3	3,2±0,1	1,000	<0,001	<0,001
Срачивание регенерата с окружающим ГХ	15	0,2±0,1	7,1±0,1	7,2±0,3	<0,001	<0,001	0,436
Степень восстановления субхондральной кости дефекта	20	5,7±1,1	4,7±0,1	4,5±0,2	<0,001	<0,001	<0,001
Общее количество баллов	100	25±0,1	38,9±0,1	41±0,3	<0,001	<0,001	<0,001

Таблица 14 – Динамика изменения показателей по морфологической шкале оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавторами на сроке 1 месяц после операции

		Клинические группы, 1мес после операции			Сравнение групп друг с другом		
		I кост. мат.	II ОТП	III ОТП+кост мат.	pI-II	pI-III	pII-III
Клеточный состав ткани в области дефекта	20	8,8±0,1	10,8±0,1	9,8±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Степень заполнения дефекта	20	15,3±0,1	13,3±1,1	13,5±0,8	1,000	1,000	1,000
Структура поверхностных слоев дефекта	10	1,3±0,1	5,3±0,1	4,4±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Структура глубоких слоев дефекта	10	1,1±0,1	6,2±0,1	7,6±0,9	<0,001	<0,001	<0,001
Окрашивание матрикса	5	3,5±0,1	3,9±0,1	4,1±0,3	<0,001	<0,001	0,015
Сращивание регенерата с окружающим ГХ	15	5,5±0,4	12,5±0,3	10,1±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Степень восстановления субхондральной кости дефекта	20	17,8±1,2	15,2±0,2	16,6±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Общее количество баллов	100	52,3±0,8	67,2±0,4	66,1±6,8	1,000	1,000	1,000

Таким образом, монопластика дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости обогащенной тромбоцитами плазмой и комбинированная пластика ОТП и деминерализованным костным материалом уже к 1 месяцу после операции приводила к практически полному восполнению объемов дефектов и формированию на уровне интактного гиалинового хряща гиалиноподобной ткани, богатой активно пролиферирующими клетками.

Стоит отметить, что использование для пластики одной ОТП приводило к более ранней активизации остеобластической реакции - как в глубоких участках дефектов, так и в их пристеночных областях. При комбинированной пластике данная реакция запаздывала, что приводило к продолжению ремоделирования субхондральной кости, даже спустя 3 месяца после операции.

На раннем сроке наблюдения – через 2 недели результаты использования этих типов пластики были сопоставимыми. Костный материал, примененный совместно с ОТП активно лизировался, что снижало общую плотность новообразованной ткани регенерата. В группе животных, которым выполняли монопластику ОТП также нельзя было говорить о формировании организованной плотной ткани регенератов к этому сроку наблюдения.

Регенераты в обеих группах были рыхло связаны с материнским ложем дефектов, не доходили до уровня интактной суставной поверхности. Эти данные, полученные при микроскопическом исследовании коррелировали с результатами инструментальных методов исследования, в частности, исследования средней плотности новообразованных регенератов с помощью компьютерной томографии.

Необходимо отметить, что на всех сроках наблюдения у животных этих групп, за редким исключением, не наблюдали деструктивно-дистрофических процессов в коленных суставах. В частности, в группе животных после комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов ОТП и деминерализованным костным материалом в двух случаях через 3 месяца наблюдали эффект «плюс ткани» регенерата, когда он выстоял над интактной суставной поверхностью и травмировал противоположную дисконгруэнтную с ним суставную поверхность. Это было связано, возможно, с избыточным количеством костного материала,

примененного для заполнения дефекта. При использовании для пластики дефектов только ОТП подобных случаев не отмечали.

Через 3 месяца наблюдений микроскопические результаты групп с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой были сопоставимыми (Таблица 15).

Таблица 15 – Динамика изменения показателей по морфологической шкале оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавторами на сроке 3 месяца после операции

		Клинические группы, 3 мес после операции			Сравнение групп друг с другом		
		I кост. мат.	II ОТП	III ОТП+кост мат.	pI-II	pI-III	pII-III
Клеточный состав ткани в области дефекта	20	15,8±0,2	15,7±1,2	15,3±1,2	1,000	0,182	0,826
Степень заполнения дефекта	20	18,6±0,8	19,3±0,8	19,4±0,9	0,018	0,010	1,000
Структура поверхностных слоев дефекта	10	2,2±0,1	6,2±0,1	5,5±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Структура глубоких слоев дефекта	10	2,5±0,1	9,6±0,1	9,5±0,1	<0,001	<0,001	0,006
Окрашивание матрикса	5	3,9±0,2	4,8±0,2	4,4±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Сращивание регенерата с окружающим ГХ	15	10,3±0,7	14,5±0,7	14,6±0,8	<0,001	<0,001	1,000
Степень восстановления субхондральной кости дефекта	20	19,6±1,3	18,6±0,3	18,9±0,1	0,003	0,047	<0,001
Общее количество баллов	100	72,9±0,2	88,7±0,2	87,6±8,2	<0,001	<0,001	1,000

Регенераты в групп кроликов с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой практически повторяли гистотипически утраченные ткани – у большинства животных восстанавливался суставной гиалиновый хрящ. В переходной зоне между регенератом и интактным гиалиновым хрящом у животных после комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов ОТП и деминерализованным костным материалом к 3 месяцу иногда отмечали формирование гиалиноподобной ткани – однако дальнейших исследований по её возможному ремоделированию не выполняли.

Общая динамика изменения показателей по морфологической шкале оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина в группах сравнения представлена на Рисунке 67.

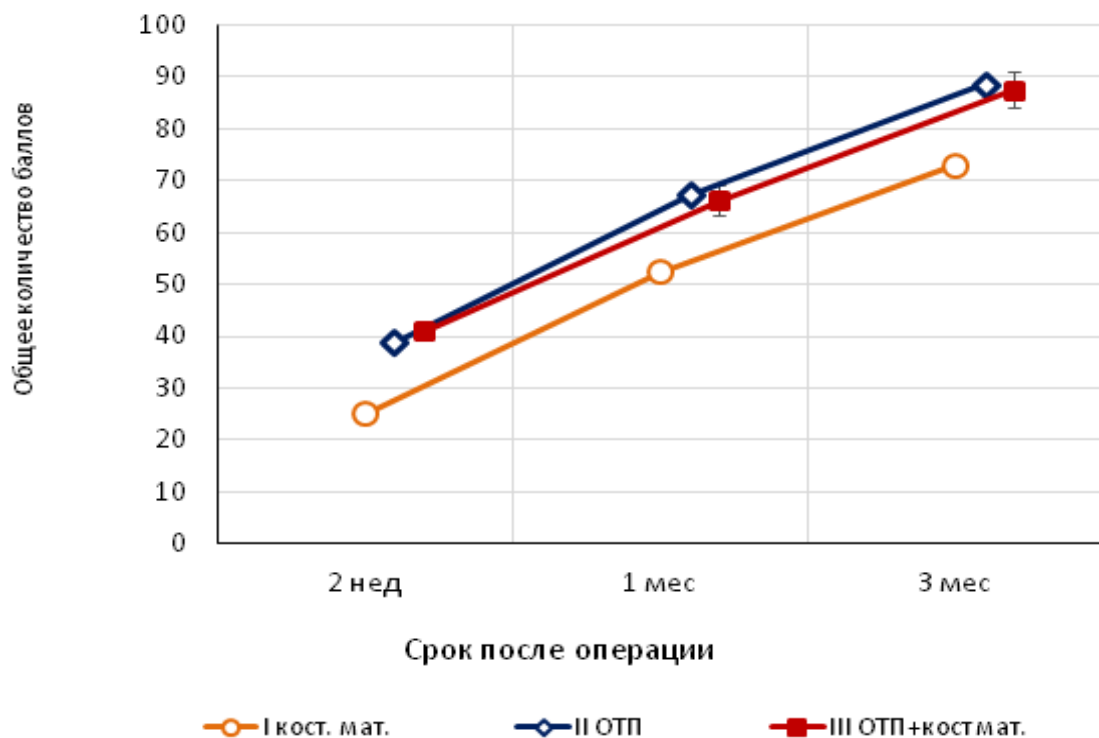


Рисунок 67 - Общая динамика изменения показателей по морфологической шкале оценки заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина в группах сравнения.

В целом в рамках данного микроскопического значимых преимуществ комбинированной пластики дефектов суставной поверхности ОТП и деминерализованным костным материалом перед монопластикой дефектов ОТП обнаружено не было.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ВИДОВ ХОНДРОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

Комплекс примененных клинических, инструментальных, морфологических методов исследования позволяет объективно оценить и сравнить эффективность рассматриваемых способов пластики костно-хрящевых дефектов надколенниковой поверхности бедренной кости.

В данной главе нами проведен статистический анализ результатов хондропластики у животных групп сравнения на каждом сроке наблюдения. Выявлены значимые отличия, возможность сопоставимости полученных результатов в группах. Также предложена оценка эффективности примененных методик хондропластики в зависимости от благоприятных и неблагоприятных исходов лечения в группах животных. Это позволило рассчитать значимые показатели доказательной медицины (Г.П. Котельников, А.С. Шпигель, 2012).

Ниже в сводных таблицах приведены обобщенные результаты обследования животных трех групп сравнения в динамике. В частности, приведены средние суммарные результаты оценки состояния конечности кроликов в послеоперационном периоде, динамика результатов термографии области коленных суставов, средние суммарные результаты оценки рентгенологических признаков остеоартроза коленных суставов по С.П. Миронову с соавторами, результаты оценки средней плотности ткани новообразованных регенератов с помощью компьютерной томографии, средние суммарные результаты оценки показателей макроскопической оценки состояния коленного сустава по S. O' Driscoll et al., средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами.

Сравнительные результаты обследования групп животных на сроке 2 недели после хондропластики представлены в Таблице 16.

Таблица 16 - Сравнительные результаты обследования групп животных на сроке 2 недели после хондропластики

Показатель, среднее значение	Норма	2 недели после операции					
		Группы животных			Статистическая значимость отличия групп		
		ДКМ	ОТП	ОТП+ДКМ	pI-II	pI-III	pII-III
Сумма баллов, клиническая оценка	24	20,3±0,1	22,8±0,1	22,1±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Температура, области сустава, °C		34,56±0,05	32,88±0,04	33,87±0,01	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, рентгенолог.шкала	15	15±0	15±0	15±0	1,000	1,000	1,000
Плотность ткани всей площади регенерата,НУ		26± 2,2	-168± 3,3	45± 0,3	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, макроскоп. оценка	10	1,7±0,2	3,5±0,1	3,7±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, морфологическая шкала	100	25±0,1	38,9±0,1	41±0,3	<0,001	<0,001	<0,001

Уже на этом раннем сроке обнаруживали статистически значимые отличия между результатами животных групп сравнения. В первую очередь, это касалось, конечно же, сравнения групп с пластикой ОТП, её комбинацией с деминерализованным костным материалом и группой, в которой выполняли монопластику костным материалом.

В группе кроликов, которым была выполнена монопластика дефектов деминерализованной спонгиозой, встречались достаточно длительные реактивные процессы в области выполнения операции, сопровождающиеся болезненностью,

ограничением движения сустава, пастозностью мягких тканей и даже синовитом, при котором приходилось осуществлять пункцию сустава. Всё это не могло не сказаться на средних суммарных результатах клинической оценки состояния коленного сустава $20,3 \pm 0,1$ балла против $22,8 \pm 0,1$ в группе с монопластикой ОТП ($p < 0,001$) и $22,1 \pm 0,1$ балла в группе с комбинированной пластикой. Аналогичную закономерность прослеживали и при анализе данных термометрии.

При оценке рентгенологических признаков развития остеоартроза по С.П. Миронову с соавторами на этом сроке значимых отличий между группами не наблюдали – так как в суставах животных еще не развивались деструктивно-дистрофические процессы.

Средние значения плотности ткани всей площади регенерата, определенные с помощью КТ достоверно отличались во всех трех группах. $26 \pm 2,2$ HU в группе животных с монопластикой костным материалом против $45 \pm 0,3$ HU ($p < 0,001$) в группе кроликов с комбинированной пластикой были обусловлены низкой скоростью резорбции костного материала при его совместном применении с ОТП и активной остеобластической реакцией в глубоких слоях дефекта.

Результаты оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al во многом коррелировали с клинической оценкой состояния конечности. Достоверные различия средних сумм баллов по данной шкале в группе с монопластикой деминерализованным костным материалом $1,7 \pm 0,2$ балла по сравнению с двумя другими $3,5 \pm 0,1$ балла пластика ОТП ($p < 0,001$) и $3,7 \pm 0,1$ балла комбинированная пластика ($p < 0,001$) были обусловлены снижением функции коленного сустава, случаями синовита и длительного реактивного воспаления в послеоперационном периоде.

Средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами в группах животных также значимо отличались. $25 \pm 0,1$ баллов в группе кроликов с монопластикой дефектов ДКМ, $38,9 \pm 0,1$ балла ($p < 0,001$) с монопластикой дефектов ОТП и $41 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) балла в группе животных с комбинированной пластикой. В целом низкие показатели во всех трех группах

были связаны с незрелостью регенерата, его рыхлой связью с подлежащим материнским ложем дефекта, диастозом между ними, только начинающимися процессами новообразования костной ткани в глубоких слоях дефекта.

Сравнительные результаты обследования групп животных на сроке 1 месяц после хондропластики представлены в Таблице 17.

Таблица 17 - Сравнительные результаты обследования групп животных на сроке 1 месяц после хондропластики

Показатель, среднее значение	Норма	1 месяц после операции					
		Группы животных			Статистическая значимость отличия групп		
		ДКМ	ОТП	ОТП+ДКМ	pI-II	pI-III	pII-III
Сумма баллов, клиническая оценка	24	23,2±0,3	23,2±0,1	23,2±0,1	1,000	1,000	1,000
Температура, области сустава, °C		32,33±0,03	31,32±0,01	31,02±0,03	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, рентгенолог. шкала	15	13,4±0,2	14,9±0,1	14,7±0,2	<0,001	<0,001	0,006
Плотность ткани всей площади регенерата, HU		83± 4,6	68 ± 7,6	111± 0,3	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, макроскоп. оценка	10	3,3±0,2	6,4±0,1	6,3±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, морфологическая шкала	100	52,3±0,8	67,2±0,4	66,1±6,8	<0,001	<0,001	<0,001

Следует отметить, что через 1 месяц по результатам клинической оценки состояния конечностей животные трех групп сравнения практически не отличались между собой. К этому времени у кроликов с монопластикой костным

материалом купировались реактивные процессы в периоперационной области, не отмечали синовитов. Соответственно, у них восстанавливалась функция коленных суставов – исчезали болезненность при движении и ограничение объема движений в суставах. Поэтому по данному показателю на этом сроке статистически значимых результатов между группами не выявили.

При этом термографическое исследование все же выявляло значимое превышение температуры области коленного сустава у животных с пластикой дефектов костным материалом $32,33 \pm 0,03$ °C ($p < 0,001$). Это было связано с высокой чувствительностью метода. Хотя на функции суставов на данном сроке это никак не отражалось.

При оценке рентгенологических признаков развития остеоартроза по С.П. Миронову с соавторами на этом сроке значимых отличий между группами с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой не наблюдали – $14,9 \pm 0,1$ баллов и $14,7 \pm 0,2$ баллов соответственно ($p = 0,006$). Деструктивно-дистрофических процессов на данном сроке в этих группах животных не отмечали. В то же время в группе кроликов с монопластикой дефектов костным материалом показатель $13,4 \pm 0,2$ баллов статистически значимо отличался от показателей в вышеперечисленных группах ($p < 0,001$). Это было связано с постепенным развитием в коленных суставах этих животных деструктивно-дистрофических процессов, хотя они и были выражены незначительно.

Средние значения плотности ткани всей площади регенерата, определенные с помощью КТ приобретали во всех трех группах положительные значения и тем не менее достоверно отличались друг от друга ($p < 0,001$). Данный показатель оставался самым высоким в группе кроликов с комбинированной пластикой $111 \pm 0,3$ HU, что было обусловлено постепенным выравниванием в этой группе скорости процессов резорбции костного материала и новообразования костной ткани на уровне субхондральной кости и по краям дефекта. Стоит отметить скачок в ускорении процессов новообразования костной ткани в нижних отделах дефекта и в группе животных с монопластикой дефектов ОТП ($68 \pm 7,6$ HU).

Результаты оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al в этот раз отличались от клинической оценки состояния конечности, в первую очередь, в группе с монопластикой дефектов костным материалом. Это было связано с тем, что непосредственно при аутопсии при описании макроскопической картины на этом сроке уже отмечали развитие деструктивно-дистрофических изменений в суставе в виде изменения цвета и прозрачности хряща, разрастании жировой ткани в суставе. В группе с монопластикой костным материалом средний показатель составил лишь $3,3 \pm 0,2$ балла против $6,4 \pm 0,1$ баллов и $6,3 \pm 0,1$ баллов в группах с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой соответственно ($p < 0,001$). Однако стоит отметить, что во второй и третьей группах на этом сроке показатели макроскопической картины не приближались к нормальным значениям.

Средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами в группах животных с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой значительно отличались ($p < 0,001$). В первую очередь, из-за неоднородности регенератов в группе с комбинированной пластикой – сохранении в их центральных частях фрагментов костного материала, изменении поверхностных зон новообразованного регенерата. Относительно группы животных с монопластикой костным материалом ($52,3 \pm 0,8$ балла), что соответствовало 50% от нормальных показателей, вторая и третья группы кроликов имели статистически значимые отличия ($p < 0,001$).

Сравнительные результаты обследования групп животных на сроке 3 месяца после хондропластики представлены в Таблице 18.

Обращает на себя внимание полная нормализация структурно-функционального состояния конечностей у животных в группе с монопластикой ОТП и с комбинированной пластикой – показатели оценки у них достигали нормы (24 балла). При этом они значительно отличались от результатов в группе животных с монопластикой костным материалом ($23,8 \pm 0,1$ балла), $p < 0,001$. Несмотря на высокие показатели, в этой группе животных уже на клиническом уровне

начинали себя проявлять развивающиеся деструктивно-дистрофические процессы в коленных суставах.

Таблица 18 - Сравнительные результаты обследования групп животных на сроке 3 месяца после хондропластики

Показатель, среднее значение	Норма	3 месяца после операции					
		Группы животных			Статистическая значимость отличия групп		
		ДКМ	ОТП	ОТП+ДКМ	pI-II	pI-III	pII-III
Сумма баллов, клиническая оценка	24	23,8±0,1	24±0	24±0	<0,001	<0,001	1,000
Температура, области сустава, °C		30,64±0,02	30,12±0,02	30,35±0,02	<0,001	<0,001	1,000
Сумма баллов, рентгенолог. шкала	15	11,2±0,1	15±0	14,8±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Плотность ткани всей площади регенерата, HU		501± 4,6	383 ± 7,6	375± 0,3	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, макроскоп. оценка	10	4,1±0,1	7,8±0,1	7,5±0,1	<0,001	<0,001	<0,001
Сумма баллов, морфологическая шкала	100	72,9±0,2	88,7±0,2	87,6±8,2	<0,001	<0,001	1,000

Стоит отметить статистически значимые преимущества результатов, полученных в группе животных с монопластикой дефектов ОТП по сравнению с группой кроликов, которым выполняли комбинированную пластику. Это касалось как средних значений сумм баллов рентгенологических признаков ПАТОЛОГИЙ СУСТАВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ (15±0 баллов против 14,8±0,1 баллов, $p<0,001$, так и результатов оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O'

Driscoll et al ($7,8 \pm 0,1$ баллов против $7,5 \pm 0,1$ баллов, $p < 0,001$. По этим показателям результаты группы с монопластикой дефектов превосходила результаты у животных с комбинированной пластикой дефектов.

Необходимо отметить статистически значимые высокие значения средней плотности ткани новообразованного регенерата в группе животных с монопластикой костным биоматериалом $501 \pm 4,6$ НУ, против $383 \pm 7,6$ НУ во второй и $375 \pm 0,3$ НУ в третьей группах. Это связано с образованием на месте дефектов в первой группе животных костно-фиброзных регенератов, даже на уровне интактного суставного гиалинового хряща.

Через 3 месяца после операции средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами в группах животных с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой значимо не отличались $88,7 \pm 0,2$ баллов и $87,6 \pm 8,2$ баллов соответственно, $p = 1,000$. При этом полученные значения в обеих группах не достигали нормы в 100 баллов.

Для подсчёта значимых показателей доказательной медицины (Г.П. Котельников, А.С. Шпигель, 2012) на сроке в 3 месяца после выполнения операции нами были определены критерии для благоприятных и неблагоприятных исходов хондропластики.

За благоприятный исход к этому времени принимали: полное восстановление функции коленного сустава по применявшейся оценочной шкале; отсутствие гипертермической реакции в области сустава при выполнении термографии, отсутствие рентгенологических признаков развития деструктивно-дистрофических процессов, соответствие не менее 80% результатов оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al нормальным значениям; соответствие не менее 80% результатов по морфологической шкале заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавторами нормальным значениям.

За неблагоприятный исход к 3 месяцу после операции принимали: выявление нарушений функции коленного сустава по применявшейся оценочной шкале;

наличие гипертермической реакции в области коленного сустава при выполнении термографии, наличие рентгенологических признаков развития деструктивно-дистрофических процессов, соответствие менее 80% результатов оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al нормальным значениям; соответствие менее 80% результатов по морфологической шкале заживления поврежденного суставного гиалинового хряща Д.А. Маланина с соавторами нормальным значениям.

При использовании данных критериев нами были получены результаты, отраженные в Таблице 19.

Таблица 19 – Частота благоприятных и неблагоприятных исходов в группах сравнения через 3 месяца после выполнения операции

Экспериментальные группы	Частота исходов, спустя 3 месяца после операции	
	Благоприятных, %, число суставов	Неблагоприятных, %, число суставов
I костный материал	27,2 (6)	72,8 (16)
II ОТП	86,4 (19)	13,6 (3)
III ОТП и костный материал	81,8 (18)	18,2 (4)

Далее были рассчитаны критерии доказательной медицины -проведена оценка и доказана эффективность комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов по сравнению с монопластикой костным материалом (Таблица 20).

Таблица 20 - Оценка эффективности комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов по сравнению с монопластикой костным материалом

ЧИЛ, %	ЧИК,%	СОР,%	САР,%	ЧБНЛ	ОШ	χ^2	p
18,2 (7,3-38,5)	72,7 (51,8-86,8)	75 (37-90,1)	54,5 (25,4-72,4)	2 (1-4)	0,08 (0,02-0,35)	11,1	<0,001

Проведена оценка и доказана эффективность монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с монопластикой костным материалом (Таблица 21).

Таблица 21 - Оценка эффективности монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с монопластикой костным материалом

ЧИЛ, %	ЧИК, %	СОР, %	САР, %	ЧБНЛ	ОШ	χ^2	p
13,6 (4,7-33,3)	72,7 (51,8-86,8)	81,3 (44,6-93,7)	59,1 (30,4-75,8)	2 (1-3)	0,06 (0,01-0,28)	13,3	<0,001

Выполнена оценка эффективности монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с комбинированной пластикой (Таблица 22). Установлено, что различия между результатами хондропластики в этих группах статистически недостоверны.

Таблица 22 - Оценка эффективности монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с комбинированной пластикой

ЧИЛ, %	ЧИК, %	СОР, %	САР, %	ЧБНЛ	ОШ	p
13,6 (4,7-33,3)	18,2 (7,3-38,5)	25 (-197,2 – 81,1)	4,5 (-18-26,7)	22 (1-3)	0,71 (0,14-3,63)	1,000

Таким образом, применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы для пластики костно-хрящевых дефектов в данном экспериментальном исследовании показало свою эффективность. Оно превосходило по структурно-функциональным, макроскопическим и морфологическим показателям результаты группы животных с монопластикой дефектов костным деминерализованным материалом на всех сроках наблюдения и было сравнимо с результатами комбинированной хондропластики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование ОТП в последнее десятилетие нашло широкое применение в отечественной и зарубежной травматологии и ортопедии. Помимо внутрисуставного введения аутоплазмы при лечении пациентов с остеоартрозом, ее применяют для лечения больных с тендинопатиями, грыжами межпозвонковых дисков и других патологиях (Д.А. Маланин с соавт., 2018; В.Г. Самодай с соавт., 2020; Migliorini F., Driessen A. et al., 2021).

С развитием артроскопической малоинвазивной хирургии появилась возможность использования для замещения дефектов суставной поверхности различных биоматериалов (К.А.Егiazарян, Г.Д. Лазишвили, 2018; Krych A.J. et al., 2020). Представляет интерес изучение эффективности ОТП для непосредственной пластики дефектов суставной поверхности, а также возможность её использования в комбинации с известными материалами для хондропластики.

При достаточно большом разнообразии клинических исследований подходы к получению ОТП, характеристике продукта, фракций, методикам применения ОТП и результаты лечения пациентов достаточно сильно разнятся (Giannini S., Cielo A. et al., 2015; Alves R., Grimalt R. et al., 2018).

Известно много как отечественных, так и зарубежных работ по использованию ОТП для внутрисуставных инъекций при лечении остеоартроза. В то же время публикаций, касающихся её применения интраоперационно не так много (М.А. Малыгина, Н.В. Боровкова, 2017; С.В. Рябинин, 2018; С.Г. Чесников с соавт, 2018; Bennell K., Hunter D., 2017; Filardo G., Previtalli D., 2021).

Доклинические исследования изучения эффективности ОТП для пластики дефектов суставной поверхности предполагают создание в эксперименте у животных моделей патологических процессов, в частности, повреждений и деструктивно-дистрофических процессов в суставах. Подобные модели известны, однако существуют определенные сложности – получение достаточного объема ОТП, трудность прижизненной оценки эффективности восстановления суставной

поверхности. Разработка новых, совершенствование известных методов инструментальной диагностики у животных способно решить эту проблему.

Данная работа посвящена решению этих актуальных задач.

С целью изучения эффективности применения обогащенной тромбоцитами аутоплазмы для хондропластики костно-хрящевых дефектов суставов, а также выполнения сравнения качества новообразованных регенератов, формирующихся при других видах пластики дефектов проведено доклиническое исследование на 53 разнополых кролика породы «Шиншилла» массой 2,5-3кг, возрастом 6-7 месяцев. Дизайн исследования выглядел следующим образом. Всем 53 животным формировали два полнослойных костно-хрящевых дефекта надколенниковой поверхности бедренной кости, после чего выполняли заполнение сформированных дефектов пластическим материалом. Кролики были разделены на три группы сравнения.

Первую группу (I) сформировали 18 животных (22 сустава), которым выполняли пластику дефектов деминерализованным костным материалом - спонгиозой, полученным из головок кроличьих бедренных костей по методике «Лиопласт» ®. Вторую группу (II) составили 17 кроликов (22 сустава), костно-хрящевые дефекты которых заполняли аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой, изготавливаемой параллельно с выполняемой операцией. Третью группу (III) сформировали 17 животных (22 сустава), которым выполняли комбинированную пластику вышеназванным костным материалом и аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой.

Комплекс примененных клинических, инструментальных, морфологических методов исследований на сроках 2 недели, 1 месяц и 3 месяца после операции позволил объективно оценить эффективность рассматриваемых способов пластики костно-хрящевых дефектов с использованием аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы.

Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов нами был модифицирован известный способ получения данного продукта. Данная процедура была регламентирована Стандартом операционной процедуры

«СОПом ИЭМБ-МОРФ 11» от 2.06.2017 года, составленным ведущим научным сотрудником ИЭМБ СамГМУ Н.Н. Сарбаевой.

В рамках данной работы нами также впервые предложено устройство для получения тромбоцитарных фракций крови (Патент РФ на изобретение № 2736004 от 11.11.2020), включающее в себя два шприца с цилиндрическими корпусами разного диаметра. Шприцы были выполнены из прозрачного материала, имеют значимые для получения технического результата особенности.

Резьбовые соединения между элементами дают возможность герметично объединять оба шприца через переходник и надежно закрывать их колпачками для предупреждения контаминации материала и защиты от него медицинских работников. Круговые метки на корпусе первого шприца и переходника позволяют контролировать уровни движения поршня при заборе цельной крови и перемещении полученных необогащенной и обогащенной тромбоцитами фракций во второй шприц. Это облегчает и стандартизирует работу врача, уменьшает излишние перемещения биоматериала внутри корпуса первого шприца и между ними, снижая его травматизацию и повышая качество, получаемых фракций, в частности ОТП.

Резьбовое соединение штока и поршня первого шприца позволяет осуществлять сразу несколько важных операций, влияющих на качество получаемой ОТП в **одном** шприце, избегая контакта материала с большим количеством поверхностей – забор цельной крови и, после откручивания штока, центрифугирование в нём же. Устройство позволяет получать фракции в закрытом цикле, что дает возможность применять его как в амбулаторных, так и в стерильных условиях операционной.

Нами был разработан оригинальный способ оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики у кроликов с помощью компьютерной томографии (Патент РФ на изобретение № 2727002 от 17.07.2020 авторов Котельникова Г.П., Долгушкина Д.А., Зельтера П. М., Лазарева В.А.).

Построение 3D модели области коленного сустава с виртуальной резекцией надколенника в режиме Volume rendering позволяет получить оптимальный обзор суставной надколенниковой поверхности бедренной кости, на которой в экспериментальной модели мы создаем дефекты и выполняем их пластику (Рисунок 8). Уже на этом этапе мы можем оценить характер восполнения дефекта регенератом относительно интактной суставной поверхности (выше, ниже, на уровне и т.д.), края дефекта, их плавность, узурацию и т.д.

Для объективной оценки качества регенерата после пластики дефектов суставной поверхности разными способами принципиальна оценка не только регенерата в целом, а также его участков – в верхнем, среднем и нижнем уровнях. Так, при создании костно-хрящевых дефектов, мы можем оценить качество новообразованного регенерата на уровне гиалинового хряща, переходной зоны и субхондральной кости.

Оценка разных участков регенерата принципиальна, так как отдельный пластический материал может обладать разным регенераторным действием в зависимости от его окружения – контакта с субхондральной костью, синовиальной жидкостью и т.д. Диаметр окружности 1 мм оптимален для оценки разных уровней регенерата у кроликов.

Способ можно применять в экспериментальных лабораториях, вивариях при выполнении доклинических исследований для оценки качества новообразованных регенератов после хондропластики у кроликов.

С целью анализа возможности применения метода СКР для оценки качества восстановления суставной поверхности, выделения значимых спектров для интактного суставного гиалинового хряща, субхондральной кости нами было выполнено несколько серий экспериментов. Доказано, что СКР позволяет проводить быстрый неинвазивный контроль состояния суставной поверхности образцов с достоверным выявлением локальных участков поражения гиалинового хряща, появлении характерных спектральных характеристик, свидетельствующих о разной глубине поражения и характере ткани на поверхности дефекта.

При деструкции гиалинового хряща в зоне его повреждения происходит усиление пиков на волновых числах 431 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_2) Холестерин, эфиры холестерина), 956 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_1) (P-O симметричное валентное)), 1065 см^{-1} (CO_3^{2-} , (C-Оплоскостное валентное), 1745 см^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ липиды) и ослабление интенсивности пиков на волновых числах 1562 см^{-1} (амид II), 1658 см^{-1} (амид I), при этом исчезает линия на 1244 см^{-1} (амид III).

Основные изменения в спектрах суставной поверхности дистального эпифиза бедренной кости кролика при различных сроках и зонах пластики, пограничных зон и зоны интактного гиалинового хряща наблюдаются для линий 956 см^{-1} (ν_1 PO_4^{3-}), 1002 см^{-1} (ν (C–C) Фенилаланин), 1069 см^{-1} ((s) симметричное растяжение CO_3^{2-}). Для оценки качества поверхности новообразованного регенерата (коэффициент К) была применена следующая формула: $K = I_{956} / I_{1660}$, где I_{956} – значение интенсивности на волновом числе 956 см^{-1} (PO_4^{3-}), I_{1660} – значение интенсивности на волновом числе 1660 см^{-1} (Амид I).

Таким образом, СКР может быть применена для оценки качества восстановления суставной поверхности после выполнения хондропластики при анализе макропрепаратов. Выделение значимых спектральных характеристик, коэффициентов может обеспечить создание моделей «идеального» состояния суставной поверхности. Разработка компьютерных программ, которые будут соотносить реальное состояние суставной поверхности с идеально возможной позволит ускорить и персонализировать оценку состояния суставной поверхности с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния.

При выполнении доклинического исследования нами в динамике были оценены следующие показатели - средние суммарные результаты оценки состояния конечности кроликов в послеоперационном периоде, динамика результатов термографии области коленных суставов, средние суммарные результаты оценки рентгенологических признаков остеоартроза коленных суставов по С.П. Миронову с соавторами, результаты оценки средней плотности ткани новообразованных регенератов с помощью компьютерной томографии, средние суммарные результаты оценки показателей макроскопической оценки состояния

коленного сустава по S. O' Driscoll et al., средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами.

Через 2 недели после операции обнаруживали статистически значимые отличия между результатами животных групп сравнения. В первую очередь, это касалось, конечно же, сравнения групп с пластикой ОТП, её комбинацией с деминерализованным костным материалом и группой, в которой выполняли монопластику костным материалом.

В группе кроликов, которым была выполнена монопластика дефектов деминерализованной спонгиозой, встречались достаточно длительные реактивные процессы в области выполнения операции, сопровождающиеся болезненностью, ограничением движения сустава, пастозностью мягких тканей и даже синовитом, при котором приходилось осуществлять пункцию сустава. Всё это не могло не сказаться на средних суммарных результатах клинической оценки состояния коленного сустава $20,3 \pm 0,1$ балла против $22,8 \pm 0,1$ в группе с монопластикой ОТП ($p < 0,001$) и $22,1 \pm 0,1$ балла в группе с комбинированной пластикой. Аналогичную закономерность прослеживали и при анализе данных термометрии.

При оценке рентгенологических признаков развития остеоартроза по С.П. Миронову с соавторами на этом сроке значимых отличий между группами не наблюдали – так как в суставах животных еще не развивались деструктивно-дистрофические процессы.

Средние значения плотности ткани всей площади регенерата, определенные с помощью КТ достоверно отличались во всех трех группах. $26 \pm 2,2$ HU в группе животных с монопластикой костным материалом против $45 \pm 0,3$ HU ($p < 0,001$) в группе кроликов с комбинированной пластикой были обусловлены низкой скоростью резорбции костного материала при его совместном применении с ОТП и активной остеобластической реакцией в глубоких слоях дефекта.

Результаты оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al во многом коррелировали с клинической оценкой состояния конечности. Достоверные различия средних сумм баллов по данной шкале в

группе с монопластикой деминерализованным костным материалом $1,7 \pm 0,2$ балла по сравнению с двумя другими $3,5 \pm 0,1$ балла пластика ОТП ($p < 0,001$) и $3,7 \pm 0,1$ балла комбинированная пластика ($p < 0,001$) были обусловлены снижением функции коленного сустава, случаями синовита и длительного реактивного воспаления в послеоперационном периоде.

Средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами в группах животных также значимо отличались. $25 \pm 0,1$ баллов в группе кроликов с монопластикой дефектов ДКМ, $38,9 \pm 0,1$ балла ($p < 0,001$) с монопластикой дефектов ОТП и $41 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) балла в группе животных с комбинированной пластикой. В целом низкие показатели во всех трех группах были связаны с незрелостью регенерата, его рыхлой связью с подлежащим материнским ложем дефекта, диастозом между ними, только начинающимися процессами новообразования костной ткани в глубоких слоях дефекта.

Следует отметить, что через 1 месяц по результатам клинической оценки состояния конечностей животные трех групп сравнения практически не отличались между собой. К этому времени у кроликов с монопластикой костным материалом купировались реактивные процессы в периперационной области, не отмечали синовитов. Соответственно, у них восстанавливалась функция коленных суставов – исчезали болезненность при движении и ограничение объема движений в суставах. Поэтому по данному показателю на этом сроке статистически значимых результатов между группами не выявили.

При этом термографическое исследование все же выявляло значимое превышение температуры области коленного сустава у животных с пластикой дефектов костным материалом $32,33 \pm 0,03$ °C ($p < 0,001$). Это было связано с высокой чувствительностью метода. Хотя на функции суставов на данном сроке это никак не отражалось.

При оценке рентгенологических признаков развития остеоартроза по С.П. Миронову с соавторами на этом сроке значимых отличий между группами с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой не наблюдали – $14,9 \pm 0,1$

баллов и $14,7 \pm 0,2$ баллов соответственно ($p=0,006$). Деструктивно-дистрофических процессов на данном сроке в этих группах животных не отмечали. В то же время в группе кроликов с монопластикой дефектов костным материалом показатель $13,4 \pm 0,2$ баллов статистически значимо отличался от показателей в вышеперечисленных группах ($p<0,001$). Это было связано с постепенным развитием в коленных суставах этих животных деструктивно-дистрофических процессов, хотя они и были выражены незначительно.

Средние значения плотности ткани всей площади регенерата, определенные с помощью КТ приобретали во всех трех группах положительные значения и тем не менее достоверно отличались друг от друга ($p<0,001$). Данный показатель оставался самым высоким в группе кроликов с комбинированной пластикой $111 \pm 0,3$ НУ, что было обусловлено постепенным выравниванием в этой группе скорости процессов резорбции костного материала и новообразования костной ткани на уровне субхондральной кости и по краям дефекта. Стоит отметить скачок в ускорении процессов новообразования костной ткани в нижних отделах дефекта и в группе животных с монопластикой дефектов ОТП ($68 \pm 7,6$ НУ).

Результаты оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al в этот раз отличались от клинической оценки состояния конечности, в первую очередь, в группе с монопластикой дефектов костным материалом. Это было связано с тем, что непосредственно при аутопсии при описании макроскопической картины на этом сроке уже отмечали развитие деструктивно-дистрофических изменений в суставе в виде изменения цвета и прозрачности хряща, разрастании жировой ткани в суставе.

В группе с монопластикой костным материалом средний показатель составил лишь $3,3 \pm 0,2$ балла против $6,4 \pm 0,1$ баллов и $6,3 \pm 0,1$ баллов в группах с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой соответственно ($p<0,001$). Однако стоит отметить, что во второй и третьей группах на этом сроке показатели макроскопической картины не приближались к нормальным значениям.

Средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с

соавторами в группах животных с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой значительно отличались ($p<0,001$). В первую очередь, из-за неоднородности регенератов в группе с комбинированной пластикой – сохранении в их центральных частях фрагментов костного материала, изменении поверхностных зон новообразованного регенерата. Относительно группы животных с монопластикой костным материалом ($52,3\pm0,8$ балла), что соответствовало 50% от нормальных показателей, вторая и третья группы кроликов имели статистически значимые отличия ($p<0,001$).

Обращает на себя внимание полная нормализация структурно-функционального состояния конечностей у животных в группе с монопластикой ОТП и с комбинированной пластикой – показатели оценки у них достигали нормы (24 балла). При этом они значительно отличались от результатов в группе животных с монопластикой костным материалом ($23,8\pm0,1$ балла), $p<0,001$. Несмотря на высокие показатели, в этой группе животных уже на клиническом уровне начинали себя проявлять развивающиеся деструктивно-дистрофические процессы в коленных суставах.

Стоит отметить статистически значимые преимущества результатов, полученных в группе животных с монопластикой дефектов ОТП по сравнению с группой кроликов, которым выполняли комбинированную пластику. Это касалось как средних значений сумм баллов рентгенологических признаков деструктивно-дистрофических заболеваний (15 ± 0 баллов против $14,8\pm0,1$ баллов, $p<0,001$, так и результатов оценки макроскопической картины коленных суставов по S. O' Driscoll et al ($7,8\pm0,1$ баллов против $7,5\pm0,1$ баллов, $p<0,001$). По этим показателям результаты группы с монопластикой дефектов превосходила результаты у животных с комбинированной пластикой дефектов.

Необходимо отметить статистически значимые высокие значения средней плотности ткани новообразованного регенерата в группе животных с монопластикой костным биоматериалом $501\pm 4,6$ НУ, против $383 \pm 7,6$ НУ во второй и $375\pm 0,3$ НУ в третьей группах. Это связано с образованием на месте

дефектов в первой группе животных костно-фиброзных регенератов, даже на уровне интактного суставного гиалинового хряща.

Через 3 месяца после операции средние суммарные результаты оценки показателей морфологической шкалы заживления поврежденного суставного гиалинового хряща по Д.А. Маланину с соавторами в группах животных с монопластикой ОТП и комбинированной пластикой значимо не отличались $88,7 \pm 0,2$ баллов и $87,6 \pm 8,2$ баллов соответственно, $p = 1,000$. При этом полученные значения в обеих группах не достигали нормы в 100 баллов.

Для подсчёта значимых показателей доказательной медицины (Г.П. Котельников, А.С. Шпигель, 2012) на сроке в 3 месяца после выполнения операции нами были определены критерии для благоприятных и неблагоприятных исходов хондропластики. Проведена оценка и доказана эффективность комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов по сравнению с монопластикой костным материалом (ОШ 0,08 (0,02-0,35), $\chi^2=11,1$, $p < 0,001$). Проведена оценка и доказана эффективность монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с монопластикой костным материалом (ОШ 0,06 (0,01-0,28), $\chi^2=13,3$, $p < 0,001$).

Выполнена оценка эффективности монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с комбинированной пластикой. Установлено, что различия между результатами хондропластики в этих группах статистически недостоверны (ОШ 0,71 (0,14-3,63), $p=1,000$)

Таким образом, применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы для пластики костно-хрящевых дефектов в данном экспериментальном исследовании показало свою эффективность. Оно превосходило по структурно-функциональным, макроскопическим и морфологическим показателям результаты группы животных с монопластикой дефектов костным деминерализованным материалом на всех сроках наблюдения и было сравнимо с результатами комбинированной хондропластики.

ВЫВОДЫ

1. Модифицирована методика получения обогащенной тромбоцитами плазмы в доклиническом экспериментальном исследовании у кроликов, что позволило получить и использовать данный продукт для выполнения монопластики и комбинированной пластики костно-хрящевых дефектов вместе с костным деминерализованным материалом.
2. Разработан и применен новый способ оценки качества новообразованной ткани после хондропластики при выполнении компьютерной томографии, который позволил дать качественную и количественную характеристику регенератов с определением их общей средней плотности и оценкой этого показателя на разных уровнях новообразованной ткани.
3. Спектроскопия комбинационного рассеяния позволяет проводить быстрый неинвазивный контроль состояния суставной поверхности образцов с достоверным выявлением локальных участков поражения гиалинового хряща, о чем свидетельствует усиление пиков на волновых числах 431 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_2) Холестерин, эфиры холестерина), 956 см^{-1} (PO_4^{3-} (ν_1) (P-O симметричное валентное)), 1065 см^{-1} (CO_3^{2-} , (C-Оплоскостное валентное)), 1745 см^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ липиды) и ослабление интенсивности пиков на волновых числах 1562 см^{-1} (амид II), 1658 см^{-1} (амид I).
4. Получены статистически значимые преимущества монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой по сравнению с использованием её комбинации с костным материалом через 3 месяца после операции - по средним значениям сумм баллов рентгенологических признаков (15 баллов против $14,8 \pm 0,1$ баллов, $p < 0,001$), по результатам оценки макроскопической картины коленных суставов по шкале S. O' Driscoll et al ($7,8 \pm 0,1$ баллов против $7,5 \pm 0,1$ баллов, $p < 0,001$), по значениям средней плотности ткани регенерата ($383 \pm 7,6\text{ HU}$ против $375 \pm 0,3\text{ HU}$, $p < 0,001$) соответственно.

5. Доказана эффективность монопластики костно-хрящевых дефектов обогащенной тромбоцитами плазмой и комбинированной пластики по сравнению с монопластикой дефектов костным материалом через 3 месяца после операции (ОШ 0,06 (0,01-0,28), $\chi^2=13,3$, $p < 0,001$ и ОШ 0,08 (0,02-0,35), $\chi^2=11,1$, $p < 0,001$ соответственно. При этом различия результатов этих двух эффективных видов пластики между собой статистически недостоверны (ОШ 0,71 (0,14-3,63), $p=1,000$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы у кроликов целесообразно использовать Стандарт операционной процедуры «СОП ИЭМБ-МОРФ 11» от 2.06.2017 года.
2. В качестве прижизненной оценки качественных и количественных характеристик новообразованных регенератов после хондропластики целесообразно использовать разработанный способ компьютерной томографии с подсчетом значений средней плотности ткани регенерата в целом и на разных уровнях – от субхондральной кости до гиалинового хряща.
3. Для получения спектральной характеристики суставной поверхности, предварительного анализа эффективности хондропластики, выявления деструктивно-дистрофических процессов при аутопсии можно применять физический оптический метод- спектроскопию комбинационного рассеяния как у животных, так и у людей.
4. Для одновременного получения разных тромбоцитарных фракций крови и обеспечения возможности лечения пациентов, как в стерильных условиях операционной, так и в амбулаторном кабинете, целесообразно применять разработанное устройство для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Персонализация в применении аутологичных факторов, в том числе, обогащенной тромбоцитами плазмы, обладающих противовоспалительным, иммуномодулирующим, регенеративным эффектом путём определения индивидуального состава, дозирования, кратности и способа применения у пациентов является перспективным направлением современной травматологии, ортопедии и регенеративной медицины в целом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДДЗ – деструктивно-дистрофическое заболевание

ДКМ – деминерализованный костный материал

ИЭМБ – Институт экспериментальной медицины и биотехнологий

КТ – компьютерная томография

ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма

РКИ - рандомизированные контролируемые испытания

СКР – спектроскопия комбинационного рассеяния

СОП – стандарт операционной процедуры

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахтямов И.Ф. Рентгено-морфологические параллели остеорегенеративного процесса при использовании препаратов на основе этиндронатов ионов лантаноидов / И.Ф. Ахтямов, Е.А. Житлова, Д.Э. Циплаков, С.В. Бойчук, Ф.В. Шакирова, Д.А. Когробейникова // Политравма, 2017, №4. – С. 6-12.
2. Ахтямов И.Ф. Динамика сывороточных реактантов острой фазы воспаления при интрамедуллярном остеосинтезе в эксперименте/ Шакирова Ф.В., Зубаирова Л.Д., Гатина Э.Б., Алиев Э.И. // Казанский медицинский журнал, 2014. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/dinamika-syvorotochnyh-reaktantov-ostroy-fazy-vospaleniya-pri-intramedullyarnom-osteosinteze-v-eksperimente> (дата обращения: 21.10.2022).
3. Ахтямов И.Ф., Хань Х.Ч./Денситометрические характеристики стимуляции репаративных процессов дефекта костной ткани в эксперименте // Травматология және ортопедия. 2019, №3-4 (49-50). –С. 111-113.
4. Ваза А.Ю., Макаров М.С., Сластинин В.В. и др. Эффективность комбинации аллогенной богатой тромбоцитами плазмы с коллагеном при лечении дефектов бедренной кости у крыс. Трансплантология. 2016;(2):36–44.
5. Горбатенко А.И., Костяная Н.О. Применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы в комплексной терапии остеоартроза коленных суставов. Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2016;(2):40–45.
6. Долгушкин Д.А. Структурная характеристика и рентгенологическая картина области суставных костно-хрящевых дефектов при их пластике комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами / Аспирантский вестник Поволжья. – Самара, 2011. – № 1-2 . – С. 151-155
7. Долгушкин Д.А. Морфо-функциональная характеристика хондрорегенераторного процесса при пластике суставных костно-хрящевых дефектов комбинированными клеточно-тканевыми трансплантатами / Фундаментальные исследования. – Москва, 2011. - №2. – с. 60-67.

8. Егиазарян К.А., Лазишвили Г.Д., Храменкова И.В., Шпак М.А., Бадриев Д.А. Алгоритм хирургического лечения больных с рассекающим остеохондритом коленного сустава // Вестник РГМУ. 2018.
9. Климовицкий В.Г., Соловьев И.А. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в лечении повреждений мягких и костных тканей. Травма (Украина). 2015;16(6):77–80.
10. Котельников, Г.П. Новый способ пластики дефектов суставного гиалинового хряща комбинированным клеточно-тканевым трансплантатом / Г.П. Котельников, Л.Т. Волова, Ю.Д. Ларцев, Д.А. Долгушкин, М.А. Тертерян // Травматология и ортопедия России. – С.-Петербург, 2010.- №1.- с. 150-155
11. Комплексная оценка эффективности терапии у больных с гонартрозом [Текст] / С. Р. Самусев, Д. А. Маланин, В. В. Новочадов [и др.] // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН и Администрации Волгоградской области. – 2008. – № 4. – С. 51–55.
12. Корнилов, Н. В. Травматология и ортопедия. Руководство для врачей в 4 т. [Текст] / Н. В. Корнилов, Э. Г. Грязнухина. – СПб. : Гиппократ, 2006. – С. 213–438.
13. Котельников, Г. П. Доказательная медицина. Научно обоснованная медицинская практика : монография [Текст] / Г. П. Котельников, А. С. Шпигель. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 242 с.
14. Котельников, Г. П. Сравнительная оценка структурных изменений тканей сустава при различных моделях экспериментального артроза [Текст] / Г. П. Котельников, Ю. В. Ларцев, А. Н. Махова // Казанский медицинский журнал. – 2006. – № 1. – С. 31–35.
15. Котельников, Г.П. Новый способ пластики дефектов суставного гиалинового хряща комбинированным клеточно-тканевым трансплантатом / Г.П. Котельников, Л.Т. Волова, Ю.Д. Ларцев, Д.А. Долгушкин, М.А. Тертерян // Травматология и ортопедия России. – С.-Петербург, 2010.- №1.- с. 150-155.
16. Куропаткин Г.В., Ахтямов И.Ф., Станислав М.Л., Кушнир В.А., Беленький И.Г., Копенкин С.С., Тамазян В.О., Везикова Н.Н., Ключевский В.В.

Оценка безопасности и эффективности Гилана G-F 20 (Синвиск-I®) у пациентов с остеоартритом коленного сустава в реальной клинической практике // Вестник травматологии и ортопедии им Н.Н. Приорова. - 2020. - Т. 27. - №2. - С. 36-44. doi: [10.17816/vto202027236-44](https://doi.org/10.17816/vto202027236-44)

17. Измалков, С.Н. Диагностика деформирующего артроза крупных суставов: методические рекомендации для слушателей ИПО, поликлинических хирургов, травматологов, врачей общей практики / С.Н. Измалков, Ю.В. Ларцев. – Самара: СамГМУ, 2003. – 16 с.

18. Ларцев, Ю.В. Новый лечебно-диагностический комплекс для больных гонартрозом: дис. ... докт. мед. наук / Ю.В. Ларцев - Самара, 2007.-349с

19. Маланин Д.А. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: экспериментальные и клинические аспекты / Д.А. Маланин, В.Б. Писарев, В.В. Новочадов. – Волгоград, 2010. – 455 с.

20. Маланин Д.А., Норкин А.И., Трегубов А.С., Демещенко М.В., Черезов Л.Л. Применение PRP-терапии при тендинопатиях вращательной манжеты и длинной головки двуглавой мышцы плеча // Травматология и ортопедия России. 2019. №3.

21. Малыгина М.А., Боровкова Н.В., Сахарова О.М., Пономарев И.Н. Применение богатой тромбоцитами плазмы при заболеваниях и повреждениях опорно-двигательного аппарата. Трансплантология. 2017;9(4):325–334. DOI:10.23873/2074-0506-2017-9-4-325-334

22. Мазуров, В. И. Остеоартроз: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение [Текст] / В. И. Мазуров, И. А. Онущенко. – СПб, 2000. – С. 122.

23. Морфогенез гиалинового хряща коленного сустава на фоне внутрисуставного введения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы и/или препарата гиалуроновой кислоты у крыс с экспериментальным остеоартрозом [Текст] / С. А. Демкин, Д. А. Маланин, Л. Н. Рогова [и др.] / Травматология и ортопедия России. – 2016. – № 22(4). – С. 76–87. – Режим доступа: [https://doi: 10.21823/2311-2905-2016-22-4-76-87](https://doi.org/10.21823/2311-2905-2016-22-4-76-87).

24. Миопластическая хондропластика дефектов хряща при деструктивно-дистрофических заболеваниях коленного сустава (экспериментальное исследование) / Котельников Г.П., Ларцев Ю.В., Зуев-Ратников С.Д., Кудашев Д.С. Долгушкин Д.А. // Статья в журнале «Морфологические ведомости», № 3, Москва, 2013.- С. 68-71

25. Морфологические результаты пластики посттравматических дефектов суставной гиалиновой хрящевой ткани разными видами трансплантатов в эксперименте/ Котельников Г.П., Волова Л.Т., Тертерян М.А., Долгушкин Д.А. // Статья в журнале «Морфологические ведомости», № 3, Москва, 2013.- С. 62-67.

26. Насонова, Е. Л. Ревматология: национальное руководство [Текст] / Е. Л. Насонова, В. А. Насонова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 573–588.

27. Насонова, В. А. Международное десятилетие болезней костей и суставов (The bone and joint Decade 2000–2010) – многодисциплинарная акция [Текст] / В. А. Насонова, Н. Г. Халтаев // Тер. архив. – 2001. – № 5. – С. 5–8.

28. Насонова, В. А. Ревматические заболевания в Российской Федерации в начале XXI века глазами статистики [Текст] / В. А. Насонова, О. М. Фоломеева, Ш. Ф. Эрдес // Тер. арх. – 2009. – № 6. – С. 5–10.

29. Новиков, Д. А. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте [Текст] / Д. А. Новиков, В. В. Новочадов. – Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2005. – 84 с.

30. Нуриахметов А.Н., Ахтямов И.Ф., Нуриахметова Т.Ю. Особенности уровня цитокинов синовиальной жидкости при длительном синовите коленного сустава различного генеза // Травматология және ортопедия. 2019, №3-4 (49-50). – С. 239-244.

31. Оболенский В.Н., Ермолова Д.А., Макаров М.С. и др. Стимуляция регенераторных процессов в хронических ранах с помощью богатой тромбоцитами аутоплазмы: клинико-экспериментальное исследование. Клиническая и экспериментальная хирургия. 2016;(1):38–43.

32. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с остеоартрозом коленного сустава II стадии [Электронный ресурс] /

Д. А. Маланин, С. А. Демкин, М. В. Демещенко [и др.] // Гений ортопедии. – 2017. – Т. 23, № 1. – С. 44–51. – Режим доступа: [https://doi: 10.18019/1028-4427-2017-23-1-44-51](https://doi.org/10.18019/1028-4427-2017-23-1-44-51).

33. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с гонартрозом III стадии [Текст] / Д. А. Маланин, В. В. Новочадов, С. А. Демкин [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 3(73). – С. 52–59.

34. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма и нестероидные противовоспалительные средства в лечении пациентов с деформирующим остеоартрозом коленного сустава III стадии / С.А. Демкин, Д.А. Маланин., М.В. Демещенко // Медицинский вестник МВД. 2015. - Т. LXXVIII.- № 5 (78). С. 22-26.

35. Особенности окислительного стресса в крови и синовиальной жидкости при гонартрозе [Текст] / В. В. Внуков, С. Б. Панина, И. В. Кролевец [и др.] // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28, № 2. – С. 284–289.

36. Особенности регенеративных процессов при пластике костно-хрящевых дефектов комбинированными трансплантатами на основе аутологичных и аллогенных культур клеток из реберной хрящевой ткани Котельников Г.П., Волова Л.Т., Долгушкин Д.А., Ларцев Ю.В., Тертерян М.А., Болтовская В.В. // Статья в журнале «Морфология» Т. 146, № 4, Санкт-Петербург, 2014.- С. 47-52

37. Отставнов, С. С. Анализ состояния здоровья населения как фактор, определяющий приоритетные сегменты рынка медицинских изделий [Электронный ресурс] / С. С. Отставнов, А. В. Бреусов // Наука и образование МГТУ им. Баумана. – 2013. – Режим доступа: technomag.bmstu.ru

38. Полесский, М.Г. Экспериментальное обоснование применения лиофилизата комплекса аутогенных тромбоцитарных факторов роста (АУТОЛТФР) для лечения больных с ложными суставами трубчатых костей нижней конечности / М.Г. Полесский, В.Г. Самодай, С.В. Рябинин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия : Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 1. – С. 109-111

39. Потребность в комплексной реабилитации инвалидов с ревматоидным артритом [Текст] / И. Л. Петрунько, М. В. Никитич, О. В. Давыдова [и др.] // Паллиат. медицина и реабилитация. – 2010. – № 3. – С. 29–32.
40. Рометар [Электронный ресурс] : инструкция по применению препарата. – Режим доступа: <http://st.vetprodukt.ru/11/1784/667/Rometar.pdf>
41. Руководство по остеопорозу [Текст] / под ред. д. м. н., проф. Л. И. Беневоленской. – 2003. – 524 с.
42. Рябинин, С.В. Использование аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении гонартроза / С.В. Рябинин, В.Г. Самодай // Практическая медицина. – 2018. – № 6. – С. 190-194.
43. Рябинин, С.В. Сравнительный клинический анализ вискосупплементарных и традиционного методов лечения остеоартроза коленных суставов / С.В. Рябинин, В.Г. Самодай // Медицинский совет. – 2017. – № 20. – С. 131-133.
44. Самодай, В. Г. Возможности использования богатой тромбоцитами аутоплазмы для лечения деформирующего остеоартроза [Текст] / В. Г. Самодай, С. В. Рябинин, М. Г. Полесский, Д. А. Атякшин // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2015. – Т. 18, № 3. – С. 63–67.
45. Самодай, В. Г. Использование аутогенных факторов роста в лечении деформирующего остеоартроза крупных суставов / В. Г. Самодай, С. В. Рябинин, М. Г. Полесский // Классика и инновации в травматологии и ортопедии : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию профессора А. П. Барабаша. – 2016. – С. 306–309.
46. Свободнорадикальное окисление в синовиальной жидкости и апоптоз хондроцитов при гонартрозе [Текст] / В. В. Внуков, И. В. Кролевец, Н. П. Милютина [и др.] // Валеология. – 2012. – № 4. – С. 38–44.
47. Светлова, М. С. Остеоартроз коленных суставов: диагностика и структурно-модифицирующая терапия Терафлексом® [Текст] / М. С. Светлова // РМЖ. – 2011. – № 31. – С. 1959.

48. Система учёта пациентов, нуждающихся в эндопротезировании тазобедренного и коленного суставов [Текст] / А. Ж. Чёрный, В. И. Кувакин, Т. Н. Воронцова [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2015. – № 4(52). – С. 176–182.

49. Соловьева, Н. И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции [Текст] / Н. И. Соловьева // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 245–255.

50. Соловьева, Н. И. Методы определения активности матриксных металлопротеиназ [Текст] / Н. И. Соловьева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 2. – С. 17–21.

51. Сравнительная морфофункциональная характеристика суставов кроликов после различных видов хондропластики/ Котельников Г.П., Волова Л.Т., Ларцев Ю.В Долгушкин Д.А. // Статья в журнале «Технологии живых систем», Т.10, № 8, 2013.- С. 48-53.

52. Фоломеева, О. М. Распространенность и социальная значимость ревматических заболеваний в Российской Федерации [Текст] / О. М. Фоломеева, Ш. Ф. Эрдес // Доктор (ревматология). – 2007. – № 10. – С. 3–12.

53. Хонинов Б.В., Сергунин О.Н., Скороглядов П.А., Бегалиев А.А. Применение внутрисуставных инъекций в лечении остеоартрозов и перспективы использования обогащенной тромбоцитами плазмы (обзор литературы) // Вестник РГМУ. 2014. №3.

54. Хрящ [Текст] / В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева, Л. И. Слуцкий [и др.]. – М. : Медицина, 1988. – 317 с.

55. Хубутя М.Ш., Высочин И.В., Кобзева Е.Н. и др. Производство и клиническое применение криоконсервированных тромбоцитов и тромбоцитных концентратов. Вестник службы крови России. 2015;(3):45–51.

56. Чесников С.Г./Опыт применения методики PRP-терапии в лечении пациентов с гонартрозом// Розенберг Д.В., Тимошенко М.Е., Дедяев С.И. // Клиническая практика. 2018. №3.

57. Широкова, Л. Ю. Применение аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы при гонартрозе [Текст] / Л. Ю. Широкова, С. М. Носков, Ю. В. Голикова // Клиническая геронтология. – 2012. – № 18. – С. 9–13.

58. Щербакова, Е. М. Заболеваемость населения России, 2014–2015 годы [Электронный ресурс] / Е. М. Щербакова // Демоскоп Weekly. – 2016. – № 683–684. – Режим доступа: <http://demoscope.ru/weekly/2016/0683/barometer683.pdf>.

59. Экспериментальная модель остеоартроза коленного сустава у крыс на фоне внутрисуставного введения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы / С. А. Демкин, Д. А. Маланин, Л. Н. Рогова, Г. Л. Снигур, Н. В. Григорьева, К. В. Байдова // Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2016. - №1(49). - С. 28-31.

60. A Fatal Sepsis Caused by Hyaluronate Knee Injection: How Much the Medical History and the Informed Consent Might Be Important? [Electronic resource] / F. Manfreda, G. Rinonapoli, A. Nardi [et al.] // Case Rep Orthop. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1518401. – URL: <https://doi.org/10.1155/2017/1518401>. – Epub 2017 Feb 23. – PubMed PMID: 28326213; PubMed Central PMCID: PMC5343234.

61. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets [Text] / S. Kubota, K. Kawata, T. Yanagita [et al.] // J Biochem. – 2004. – No. 136. – P. 279–282.

62. Advantages of Pure Platelet-Rich Plasma Compared with Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma in Treating Rabbit Knee Osteoarthritis [Text] / W. J. Yin, H. T. Xu, J. G. Sheng [et al.] // Med Sci Monit. – 2016 Apr 17. – No. 22. – P. 1280–1290. – PubMed PMID: 27086145; PubMed Central PMCID: PMC4837928.

63. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. Skin Appendage Disord. 2018 Jan;4(1):18-24. doi: 10.1159/000477353. Epub 2017 Jul 6. PMID: 29457008; PMCID: PMC5806188

64. Andia, I. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies [Text] / I. Andia, M. Sanchez, N. Maffulli // Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – No. 12(1). – P. 7–22.

65. Anitua, E. Allogeneic Platelet-Rich Plasma: At the Dawn of an Off-the-Shelf Therapy? [Electronic resource] / E. Anitua, R. Prado, G. Orive // Trends

Biotechnol. – 2017 Feb. – No. 35(2). – P. 91–93. – URL: <https://doi:10.1016/j.tibtech.2016.11.001>. – Epub 2016 Nov 28. – PubMed PMID: 27908451

66. Arthritis Research & Therapy [Electronic resource] / Quero [et al.]. – 2013. – No. 15. – P. R94. – URL: <http://arthritis-research.com/content/15/4/R94>

67. Autologous conditioned serum (ortokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis [Text] / A. W. Baltzer, C. Moser, S. A. Jansen [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2009. – No. 17. – P. 152–160.

68. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study [Text] / J. U. Carmona, D. Arguelles, F. Climent [et al.] // J Equin Vet Sci. – 2007. – No. 27. – P. 167–170.

69. Balazs, E. A. Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results [Text] / E. A. Balazs // Surg. Technol. Int. – 2004. – Vol. 12. – P. 278–289.

70. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review [Text] / Y. Zhu, M. Yuan, H. Y. Meng [et al.] // Osteoarthritis and Cartilage. – 2013. – Vol. 21, No. 11. – P. 1627–1637.

71. Berghoff, W. J. Platelet-rich plasma application during closure following total knee arthroplasty [Text] / W. J. Berghoff, W. S. Pietrzak, R. D. Rhodes // Orthopedics. – 2006. – No. 29. – P. 590–598.

72. Bennell KL, Hunter DJ, Paterson KL. Platelet-Rich Plasma for the Management of Hip and Knee Osteoarthritis. Curr Rheumatol Rep. 2017 May;19(5):24. doi: 10.1007/s11926-017-0652-x. PMID: 28386761.

73. Buckwalter, J. A. Articular cartilage injuries [Text] / J. A. Buckwalter // Clin. Orthop. – 2002. – Vol. 402. – P. 21–37.

74. Carmeliet, P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. [Text] / P. Carmeliet, R. K. Jain // Nature. – 2011. – No. 473. – P. 298–307.

75. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells [Text] / J. Woodall, M. Tucci, A. Mishra [et al.] // Biomed Sci Instrum. – 2007. – No. 43. – P. 266–271.

76. Cerza, F. Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis [Text] / F. Cerza, S. Carni, A. Carcangiu // *Am J Sports Med.* – 2012. – No. 40. – P. 2822–2827.

77. Chondroinduction is the main cartilage repair response to microfracture and microfracture with BST-CarGel: Results as shown by ICRS-II histological scoring and a novel zonal collagen type scoring method of human clinical biopsy specimens [Text] / C. D. Hoemann, N. Tran-Khanh, A. Chevrier [et al.] // *Am. J. Sports Med.* – 2015.

78. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model [Electronic resource] / S. Elmorsy, T. Funakoshi, F. Sasazawa [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2014 Jan. – No. 22(1). – P. 121–127. – URL: <https://doi:10.1016/j.joca.2013.10.005>. – PubMed PMID: 24185110.

79. Clinical effectiveness in severe knee osteoarthritis after intra-articular platelet-rich plasma therapy in association with hyaluronic acid injection: three case reports [Electronic resource] / S. H. Chen, T. S. Kuan, M. J. Kao [et al.] // *Clin Interv Aging.* – 2016 Sep 8. – No. 11. – P. 1213–1219. – eCollection 2016 Sep 8. – PubMed PMID: 27660427; PubMed Central PMCID: PMC5019165

80. Combination of Intra-Articular and Intraosseous Injections of Platelet Rich Plasma for Severe Knee Osteoarthritis: A Pilot Study [Electronic resource] / M. Sánchez, D. Delgado, P. Sánchez [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 4868613. – URL: <https://doi:10.1155/2016/4868613>. – Epub 2016 Jul 4. – PubMed PMID: 27462609; PubMed Central PMCID: PMC4947638.

81. Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: a systematic review and meta-analysis [Electronic resource] / K.V. Chang, C. Y. Hung, F. Aliwarga [et al.] // *Arch Phys Med Rehabil.* – 2014 Mar. – No. 95(3). – P. 562–575. – URL: <https://doi:10.1016/j.apmr.2013.11.006>. Review. – PubMed PMID: 24291594.

82. Comparison of Single Intra-Articular Injection of Novel Hyaluronan (HYA-JOINT Plus) with Synvisc-One for Knee Osteoarthritis: A Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of Efficacy and Safety [Electronic resource] / S. F. Sun, C. W. Hsu,

H. S. Lin [et al.] // J Bone Joint Surg Am. – 2017 Mar 15. – No. 99(6). – P. 462–471. – URL: [https://doi: 10.2106/JBJS.16.00469](https://doi.org/10.2106/JBJS.16.00469). – PubMed PMID: 28291178

83. Comparison of the chondroprotective effect of a novel hydrogel compound and traditional hyaluronate on rat cartilage in a papain-induced osteoarthritis model [Electronic resource] / E. Şükür, C. Talu, Y. E. Akman [et al.] // Acta Orthop Traumatol Turc. – 2016 Aug. – No. 50(4). – P. 458–463. – URL: [https://doi: 10.1016/j.aott.2016.07.008](https://doi.org/10.1016/j.aott.2016.07.008). – PubMed PMID: 27449593

84. Core binding factor α plays a critical role during chondrocyte differentiation. [Text] / N. R. Park, K. E. Lim, M. S. Han [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2016. – No. 231. – P. 162–171.

85. Crane, D. Platelet Rich Plasma (PRP) Matrix Grafts [Text] / D. Crane // Practical pain management. – 2008. – No. 8. – P. 12–26.

86. Di Cesare, P. E. Pathogenesis of osteoarthritis / P. E. Di Cesare, S. B. Abramson // Kelley's Textbook of Rheumatology / Jr. E. Harris (Eds.). – Philadelphia : Elsevier Saunders; 2005. – P. 1493–1513.

87. Differences in multijoint radiographic osteoarthritis phenotypes among African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis project [Electronic resource] / A. E. Nelson, J. B. Renner, T. A. Schwartz [et al.] // Arthritis Rheum. – 2011 Dec. – No. 63(12). – P. 3843–3852. – URL: [https://doi:10.1002/art.30610](https://doi.org/10.1002/art.30610).

88. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C Relevance to Inflammation in Rheumatoid Arthritis [Text] / M. Xue, L. March, P. N. Sambrook [et al.] // Arthritis Rheumatism. – 2007. – Vol. 56, No. 9. – P. 2864–2874.

89. Does platelet-rich plasma enhance microfracture treatment for chronic focal chondral defects? An in vivo study performed in a rat model [Text] / O. Hapa, H. Cakici, H. Y. Yuksel [et al.] // Acta Orthop Traumatol Turc. – 2013. – No. 47(3). – P. 201–207.

90. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits [Text] / C. I. Serra, C. Soler, J. M. Carillo [et al.] // Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. – 2013. – No. 21(8). – P. 1730–1736.

91. Effect of hyaluronic acids as chondroprotective in experimental model of osteoarthritis [Electronic resource] / M. Z. Oliveira, M. B. Albano, M. M. Namba [et al.] // *Rev Bras Ortop.* – 2014 Feb 12. – No. 49(1). – P. 62–68. – URL: [https://doi: 10.1016/j.rboe.2014.01.007](https://doi.org/10.1016/j.rboe.2014.01.007). – PubMed PMID: 26229774; PubMed Central PMCID: PMC4511756.

92. Effect of Leukocyte Concentration on the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis [Electronic resource] / J. C. Riboh, B. M. Saltzman, A. B. Yanke [et al.] // *Am J Sports Med.* – 2016 Mar. – No. 44(3). – P. 792–800. – URL: [https://doi: 10.1177/0363546515580787](https://doi.org/10.1177/0363546515580787). – Epub 2015 Apr 29. – PubMed PMID: 25925602.

93. Effect of platelet concentration in plateletrich plasma on peri-implant bone regeneration [Text] / G. Weibrich, T. Hansen, W. Kleis [et al.] // *Bone.* – 2004. – No. 34. – P. 665–671.

94. Effect of single injection of platelet-rich plasma in comparison with corticosteroid on knee osteoarthritis: a double-blind randomized clinical trial [Electronic resource] / B. Forogh, E. Mianehsaz, S. Shoaee [et al.] // *J Sports Med Phys Fitness.* – 2016 Jul-Aug. – No. 56(7–8). – P. 901–908. – Epub 2015 Jul 14. – PubMed PMID: 26173792.

95. Efficacy and safety of cross-linked hyaluronic acid single injection on osteoarthritis of the knee: a post-marketing Phase IV study [Electronic resource] / K. Bashaireh, Z. Naser, K. A. Hawadya [et al.] // *Drug Des Devel Ther.* – 2015 Apr 8. – No. 9. – P. 2063–2072. – URL: [https://doi: 10.2147/DDDT.S81524](https://doi.org/10.2147/DDDT.S81524). – PubMed PMID: 25897212; PubMed Central PMCID: PMC4396588.

96. Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review [Electronic resource] / C. J. Meheux, P. C. McCulloch, D. M. Lintner [et al.] // *Arthroscopy.* – 2016 Mar. – No. 32(3). – P. 495–505. – URL: [https://doi: 10.1016/j.arthro.2015.08.005](https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.08.005). – Epub 2015 Oct 1. Review. – PubMed PMID: 26432430.

97. Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials [Electronic resource] / W. L. Dai,

A. G. Zhou, H. Zhang [et al.] // *Arthroscop.* – 2017 Mar. – No. 33(3). – P. 659–670.e1. – URL: [https://doi: 10.1016/j.arthro.2016.09.024](https://doi.org/10.1016/j.arthro.2016.09.024). – Epub 2016 Dec 22. – PubMed PMID: 28012636.

98. Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis [Electronic resource] / A. B. Laudy, E. W. Bakker, M. Rekers [et al.] // *Br J Sports Med.* – 2015 May. – No. 49(10). – P. 657–672. – URL: [https://doi: 10.1136/bjsports-2014-094036V](https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-094036V). – Epub 2014 Nov 21. Review. – PubMed PMID: 25416198.

99. Efficacy of Platelet-Rich Plasma versus Hyaluronic Acid for treatment of Knee Osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis [Electronic resource] / H. N. Sadabad, M. Behzadifar, F. Arasteh [et al.] // *Electron Physician.* – 2016 Mar 25. – No. 8(3). – P. 2115–2122. – URL: [https://doi: 10.19082/2115](https://doi.org/10.19082/2115). – eCollection 2016 Mar 25. – PubMed PMID: 27123220; PubMed Central PMCID: PMC4844477.

100. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II [Text] / R. C. Lawrence, D.T. Felson, C. G. Heimick [et al.] // *Arth.Rheum.* – 2008. – V. 58. – P. 26–35.

101. Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study [Text] / P. Bettica, G. Cline, D. J. Hart [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2002. – Vol. 46. – P. 3178–3184.

102. Experimental osteoarthritis model by means of medial meniscectomy in rats and effects of diacerein administration and hyaluronic acid injection [Electronic resource] / M. U. Rezende, A. J. Hernandez, C. R. Oliveira [et al.] // *Sao Paulo Med J.* – 2015 Feb. – No. 133(1). – P. 4–12. – URL: [https://doi: 10.1590/1516-3180.2013.6730001](https://doi.org/10.1590/1516-3180.2013.6730001). – PubMed PMID: 25424775.

103. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors [Text] / E. Anitua, M. Sanchez, M. M. Zalduendo [et al.] // *Cell Prolif.* – 2009. – No. 42. – P. 162–170.

104. Filardo G, Previtali D, Napoli F, Candrian C, Zaffagnini S, Grassi A. PRP Injections for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cartilage.* 2021 Dec;13(1_suppl):364S-375S. doi:

10.1177/1947603520931170. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32551947; PMCID: PMC8808870.

105. Foster, T. E. Platelet rich plasma: from basic science to clinical application [Text] / T. E. Foster, B. L. Puskas, B. R. Mandelbaum // *Am J Sports Med.* – 2009. – No. 11. – P. 2259–2272.

106. Functional genomics of osteoarthritis [Text] / T. Aigner, E. Bartnik, A. Zien [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2002. – Vol. 3. – P. 635–650.

107. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, Falisi G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(6):927-30. PMID: 25855914.

108. Gobbi, D. L. The effects of repeated intra-articular PRP injections on clinical outcomes of early osteoarthritis of the knee [Text] / D. L. Gobbi, G. Karnatzikos // *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy.* – 2014.

109. Growth factors in the treatment of early osteoarthritis [Text] / R. Civinini, L. Nistri, C. Martini [et al.] // *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* – 2013. – Vol. 10, No. 1. – P. 26–29.

110. Guided differentiation of bone marrow stromal cells on co-cultured cartilage and bone scaffolds [Text] / P. Lee, K. Tran, G. Zhou [et al.] // *Soft Matter.* – 2015. – No. 11. – P. 7648–7655.

111. Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma – PRP, or Platelet-Rich Fibrin – PRF): the international classification of the POSEIDO [Text] / D. M. Dohan Ehrenfest, G. Sammartino, J. A. Shibli [et al.] // *POSEIDO.* – 2013. – No. 1(1). – P. 17–27.

112. Guner, S. Analyzing the effects of platelet gel on knee osteoarthritis in the rat model [Electronic resource] / S. Guner, O. Buyukbebeci // *Clin Appl Thromb Hemost.* – 2012. – URL: <https://doi:10.1177/1076029612452117>

113. Harrison, P. Platelet function analysis [Text] / P. Harrison // *Blood Reviews.* – 2005. – Vol. 19, No. 2. – P. 111–123.

114. High molecular weight hyaluronan inhibits proinflammatory cytokine-induced production of matrix metalloproteinases by synovial cells and articular

cartilage [Text] / T. Yasuda, M. Shimizu, S. M. Julovi [et al.] // Clin Rheumatol Related Res. – 2004. – No. 16. – P. 246–250.

115. Homologous platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis in selected elderly patients: an open-label, uncontrolled, pilot study [Electronic resource] / C. Bottegoni, L. Dei Giudici, S. Salvemini [et al.] // Ther Adv Musculoskelet Dis. – 2016 Apr. – No. 8(2). – P. 35–41. – URL: [https://doi: 10.1177/1759720X16631188](https://doi.org/10.1177/1759720X16631188). Epub 2016 Feb 12. – PubMed PMID: 27047571; PubMed Central PMCID: PMC4794951.

116. Hootman, J. M. Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations [Text]/ J. M. Hootman, Ç. G. Helmick // Arthr.Rheum. – 2006. – Vol. 54. – P. 226–229.

117. Hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis with emphasis on the efficacy of different products [Electronic resource] / S. Colen, Bekerom van den M. P., M. Mulier [et al.] // BioDrugs. – 2012 Aug 1. – No. 26(4). – P. 257–268. – URL: [https://doi: 10.2165/11632580-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11632580-000000000-00000). – Review. PMID:22734561

118. Hyaluronic acid injection therapy for osteoarthritis of the knee: concordant efficacy and conflicting serious adverse events in two systematic reviews [Text] / C. E. O'Hanlon, S. J. Newberry, M. Booth [et al.] // Syst Rev. – 2016 Nov 4. – No. 5(1). – P. 186. – PubMed PMID: 27814744; PubMed Central PMCID: PMC5097414.

119. Hyaluronic Acid Suppresses the Expression of Metalloproteinases in Osteoarthritic Cartilage Stimulated Simultaneously by Interleukin 1 β and Mechanical Load [Electronic resource] / F. Pohlig, F. Guell, U. Lenze [et al.] // PLoS One. – 2016 Mar 2.– Vol. 1(3). – e0150020. – URL: [https://doi: 10.1371/journal.pone.0150020](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150020). – PubMed PMID: 26934732; PubMed Central PMCID: PMC4774918.

120. Hyaluronic Acid Suppresses the Expression of Metalloproteinases in Osteoarthritic Cartilage Stimulated Simultaneously by Interleukin 1 β and Mechanical Load [Electronic resource] / F. Pohlig, F. Guell, U. Lenze [et al.] // PLoS One. – 2016

Mar 2. – No. 11(3). – e0150020. – URL: [https://doi: 10.1371/journal.pone.0150020](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150020). – PubMed PMID: 26934732; PubMed Central PMCID: PMC4774918.

121. Hyaluronic acid viscosupplementation and osteoarthritis: current uses and future directions [Text] / E. J. Strauss, J. A. Hart, M. D. Mille [et al.] // *Am. J. Sports Med.* – 2009. – Vol. 37, No. 8. – P. 1636–1644.

122. Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms [Electronic resource] / P. Li, D. Raitcheva, M. Hawes [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2012 Nov. – No. 20(11). – P. 1336–1346. – URL: [https://doi: 10.1016/j.joca.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.07.004). – PubMed PMID: 22809835.

123. Hyun, S. H. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis [Text] / S. H. Hyun, A. K. Hyun // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – No. 16. – P. 26035–26054.

124. Ildar Akhtiamov, Abduiiyah Al Muhit, Md Shamsul Alom, Malik Faheem Ahsan, Al-lami Mastafa Ali Jasim The Efficiency of Conservative Methods of the Treatment at Early Stage of Osteoarthritis / *International Journal of Orthopaedics Research*, 2021, V. 4, issue 1, 41-44

125. Infiltrative treatment with platelet rich plasma (PRP) in gonarthrosis [Text] / G. Mangone, A. Orioli, A. Pinna [et al.] // *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* – 2014. – Vol. 11, No. 1. – P. 67–72.

126. Inhibition of VEGF or TGF-beta signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling [Text] / T. E. Walshe, V. S. Dole, A. S. R. Maharaj [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – No. 29. – P. 1185–1192.

127. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee [Text] / M. Saito, K. A. Takahashi, Y. Arai [et al.] // *Clin Exp Rheumatol.* – 2009. – Vol. 27(2). – P. 201–207.

128. Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis [Text] / J. L. Hsieh, P. C. Shen, A. L. Shiau [et al.] // *J Orthop Res.* – 2010. – No. 28. – P. 1300–1306.

129. Intra-articular hyaluronate, tenoxicam and vitamin E in a rat model of osteoarthritis: evaluation and comparison of chondroprotective efficacy [Electronic resource] / F. U. Ozkan, G. Uzer, I. Türkmen [et al.] // *Int J Clin Exp Med*. – 2015 Jan 15. – No. 8(1). – P. 1018–1026. – PubMed PMID: 25785088; PubMed Central PMCID: PMC4358543.

130. Intra-Articular Injection of Cross-Linked Hyaluronic Acid-Dexamethasone Hydrogel Attenuates Osteoarthritis: An Experimental Study in a Rat Model of Osteoarthritis [Text] / Z. Zhang, X. Wei, J. Gao [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2016. – No. 17. – P. 411.

131. Intra-articular injection of photo-activated platelet-rich plasma in patients with knee osteoarthritis: a double-blind, randomized controlled pilot study [Electronic resource] / K. L. Paterson, M. Nicholls, K. L. Bennell [et al.] // *BMC Musculoskelet Disord*. – 2016 Feb 9. – No. 17. – P. 67. – URL: [https://doi: 10.1186/s12891-016-0920-3](https://doi.org/10.1186/s12891-016-0920-3). – PubMed PMID: 26861957; PubMed Central PMCID: PMC4748460.

132. Intra-Articular Injections of Platelet-Rich Plasma versus Hyaluronic Acid in the Treatment of Osteoarthritic Knee Pain: A Randomized Clinical Trial in the Context of the Spanish National Health Care System [Electronic resource] / E. Montañez-Heredia, S. Irizar, P. J. Huertas [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2016 Jul 2. – No. 17(7). – PII: E1064. – URL: [https://DOI: 10.3390/ijms17071064](https://doi.org/10.3390/ijms17071064). – PubMed PMID: 27384560; PubMed Central PMCID: PMC4964440.

133. Is Local Viscosupplementation Injection Clinically Superior to Other Therapies in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses [Electronic resource] / K. A. Campbell, B. J. Erickson, B. M. Saltzman [et al.] // *Arthroscopy*. – 2015 Oct. – No. 31(10). – P. 2036–45.e14. – URL: [https://doi: 10.1016/j.arthro.2015.03.030](https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.03.030). Review. – PubMed PMID: 25998016.

134. Issa, S. N. Epidemiology of osteoarthritis: an update [Text] / S. N. Issa, L. Sharma // *Curr Rheumatol Rep*. – 2006 Feb. – No. 8(1). – P. 7–15.

135. Kato Y, Yanada S, Morikawa H, Okada T, Watanabe M, Takeuchi S. Effect of Platelet-Rich Plasma on Autologous Chondrocyte Implantation for Chondral Defects: Results Using an In Vivo Rabbit Model. *Orthop J Sports Med*. 2022 Mar

10;10(3):23259671221079349. doi: 10.1177/23259671221079349. PMID: 35295553; PMCID: PMC8918747.

136. Kazemi, D. Leukocyte and Platelet Rich Plasma (L-PRP) Versus Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) For Articular Cartilage Repair of the Knee: A Comparative Evaluation in an Animal Model [Electronic resource] / D. Kazemi, A. Fakhrijou // Iran Red Crescent Med J. – 2015 Oct 28. – No. 17(10). – e19594. – URL: [https://doi: 10.5812/ircmj.19594](https://doi.org/10.5812/ircmj.19594). – eCollection 2015 Oct 28. PubMed PMID: 26568857; PubMed Central PMCID: PMC4640060.

137. Knee alignment does not predict incident osteoarthritis: the Framingham osteoarthritis study [Text]// Hunter D., Niu J., Felson D. [et al.] // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56(4). – P. 1212–1218.

138. Krych AJ, Saris DBF, Stuart MJ, Hacken B. Cartilage Injury in the Knee: Assessment and Treatment Options. J Am Acad Orthop Surg. 2020 Nov 15;28(22):914-922. doi: 10.5435/JAAOS-D-20-00266. PMID: 32796370.

139. Kwon, D. R. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase-induced knee osteoarthritis in a rabbit model [Text] / D. R. Kwon, G. Y. Park, S. U. Lee // Ann Rehabil Med. – 2012. – No. 36(4). – P. 458–465.

140. Li H, Sun S, Liu H, Chen H, Rong X, Lou J, Yang Y, Yang Y, Liu H. Use of a biological reactor and platelet-rich plasma for the construction of tissue-engineered bone to repair articular cartilage defects. Exp Ther Med. 2016 Aug;12(2):711-719. doi: 10.3892/etm.2016.3380. Epub 2016 May 23. PMID: 27446265; PMCID: PMC4950899.

141. Lubowitz, J. H. Editorial Commentary: Platelet-Rich Plasma Improves Knee Pain and Function in Patients With Knee Osteoarthritis [Electronic resource] / J. H. Lubowitz // Arthroscopy. – 2015 Nov. – No. 31(11). – P. 2222–2223. – URL: [https://doi: 10.1016/j.arthro.2015.08.022](https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.08.022). – PubMed PMID: 26542203

142. Malfait, A.M. A commentary on modelling osteoarthritis pain in small animals [Text] / A. M. Malfait, C. B. Little, J. J. McDougall // Osteoarthritis and Cartilage. – 2013. – No. 21(9). – 1316–26.

143. McMahon, L. A. Biomechanics and mechanobiology in osteochondral tissues [Text] / L. A. McMahon, F. J. O'Brien, P. J. Prendergast // *Regen. Med.* – 2008. – No. 3. – P. 743–759.

144. Meniscal tear and extrusion are strongly associated with the progression of knee osteoarthritis as assessed by quantitative magnetic resonance imaging [Text] / M. J. Berthiaume, J. P. Raynald, J. Martel-Pelletier [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64. – P. 556–563.

145. Migliorini F, Driessen A, Quack V, Sippel N, Cooper B, Mansy YE, Tingart M, Eschweiler J. Comparison between intra-articular infiltrations of placebo, steroids, hyaluronic and PRP for knee osteoarthritis: a Bayesian network meta-analysis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2021 Sep;141(9):1473-1490.

146. Mishra, A. Treatment of Chronic Elbow Tendinosis With Buffered Platelet-Rich Plasma [Electronic resource] / Allan Mishra, Terri Pavelko // *Am J Sport. Med.* – 2006. – No. 34. – P. 1774. – Originally published online May 30, 2006. – URL: <https://doi: 10.1177/0363546506288850>.

147. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: Mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF [Text] / P. Bendinelli, E. Matteucci, G. Dogliotti [et al.] // *Journal of Cellular Physiology.* – 2010. – Vol. 225, No. 3. – P. 757–766.

148. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappaB inhibition via HGF [Text] / P. Bendinelli, E. Matteucci, G. Dogliotti [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2010. – No. 225. – P. 757–766.

149. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects [Text] / A. Kerin, P. Patwari, K. Kuettner [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – Vol. 59. – P. 27–35.

150. Morehead, K. Osteoarthritis. What therapies for this disease of many causes? [Text] / K. Morehead, K. E. Sack // *Postgrad. Med.* – 2003. – Vol. 114, No. 5. – P. 11–17.

151. Moreland, L. W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action [Electronic resource] /

L.W. Moreland // *Arthritis Res Ther.* – 2003. – No. 5. – P. 54–67. – URL: <https://doi:10.1186/ar855/>

152. Naja M, Fernandez De Grado G, Favreau H, Scipioni D, Benkirane-Jessel N, Musset AM, Offner D. Comparative effectiveness of nonsurgical interventions in the treatment of patients with knee osteoarthritis: A PRISMA-compliant systematic review and network meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Dec 10;100(49):e28067. doi:

153. Nuriakhmetov, A.N., Akhtyamov, I.F., Tsyplakov, D.E. *et al.* Effect of Triamcinolone Acetonide on Articular Cartilage. *BioNanoSci.* **12**, 496–501 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00978-y>

154. Nin, Darren Z; Chen, Ya-Wen; Talmo, Carl T.; Hollenbeck, Brian L.; Mattingly, David A.; Niu, Ruijia; Chang, David C.; Smith, Eric L.. Costs of Nonoperative Procedures for Knee Osteoarthritis in the Year Prior to Primary Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery*: October 5, 2022 - Volume 104 - Issue 19 - p 1697-1702 doi: 10.2106/JBJS.21.01415

155. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. [Text] / J. E. Peterson, D. Zurakowski, J. E. Italiano [et al.] // *Am J Haematol.* – 2010. – No. 85. – P. 487–493.

156. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis [Text] / T. E. McAlindon, R. R. Bannuru, M. C. Sullivan [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2014. – Vol. 22, No. 3. – P. 363–388.

157. Pelletier, J. P. Most recent developments in strategies to reduce the progression of structural changes in osteoarthritis: today and tomorrow [Text] / J. P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, J. P. Raynauld // *Arthritis Res. Ther.* – 2006. – Vol. 8, No. 2. – P. 206–210.

158. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model [Text] / E. Kon, G. Filardo, M. Delcogliano [et al.] // *BMC Musculoskeletal Disorders.* – 2010. – Vol. 11. – Article 220.

159. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic

patients [Text] / E. Anitua, M. Sanchez, A. T. Nurden [et al.] // *Rheumatology*. – 2007. – No. 46. – P. 1769–1772.

160. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution [Text] / D. M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss [et al.] // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. – 2006. – No. 101(3). – e37–44.

161. Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel [Text] / P. Everts, J. Knape, G. Weibrich [et al.] // *A Review*. – 2006. – No. 38. – P. 174–187.

162. Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: evidence-based recommendations for treatment [Text] / W. K. Hsu, A. Mishra, S. R. Rodeo [et al.] // *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. – 2013. – Vol. 21, No. 12. – P. 739–748.

163. Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis [Text] / E. Kon, B. Mandelbaum, R. Buda [et al.] // *Arthroscopy*. – 2011. – Vol. 27, No. 11. – P. 1490–1501.

164. Platelet-Rich Plasma Intra-articular Knee Injections Show No Superiority Versus Viscosupplementation: A Randomized Controlled Trial [Electronic resource] / G. Filardo, B. Di Matteo, A. Di Martino [et al.] // *Am JSports Med*. – 2015 Jul. – No. 43(7). – P. 1575–1582. – URL: [https://doi: 10.1177/0363546515582027](https://doi.org/10.1177/0363546515582027). – PubMed PMID: 25952818.

165. Platelet-rich plasma treatment in symptomatic patients with knee osteoarthritis: preliminary results in a group of active patients [Text] / Gobbi, G. Karnatzikos, V. Mahajan [et al.] // *Sports Health*. – – 2012. – Vol. 4, No. 2. – P. 162–172.

166. Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial [Text] / G. Filardo, E. Kon, A. di Martino [et al.] // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2012. – Vol. 13. – Article 229.

167. Platelet-rich plasma: Growth factors and pro- and anti-inflammatory properties [Text] / H. El-Sharkawy, A. Kantarci, J. Deady [et al.] // *Periodontol.* – 2007. – No. 78. – P. 661–669.

168. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration [Text] / G. Filardo, E. Kon, A. Roffi [et al.] // *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* – 2015. – No. 23. – P. 2459–2474.

169. Pötter N, Westbrook F, Grad S, Alini M, Stoddart MJ, Schmal H, Kubosch D, Salzmann G, Kubosch EJ. Evaluation of the influence of platelet-rich plasma (PRP), platelet lysate (PL) and mechanical loading on chondrogenesis in vitro. *Sci Rep.* 2021 Oct 12;11(1):20188. doi: 10.1038/s41598-021-99614-0. PMID: 34642434; PMCID: PMC8510996.

170. Preventive effects of hyaluronan from deterioration of gait parameters in surgically induced mice osteoarthritic knee model [Electronic resource] / Y. Muramatsu, T. Sasho, M. Saito [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2014 Jun. – No. 22(6). – P. 831–835. – URL: [https://doi: 10.1016/j.joca.2014.03.016](https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.03.016). – PubMed PMID: 24704496.

171. Protective Nature of Platelet-Rich Plasma Against Chondrocyte Death When Combined With Corticosteroids or Local Anesthetics [Electronic resource] / T. J. Durant, C. R. Dwyer, M. B. McCarthy [et al.] // *Am J Sports Med.* – 2017 Jan. – No. 45(1). – P. 218–225. – URL: [https://doi: 10.1177/0363546516664161](https://doi.org/10.1177/0363546516664161). – Epub 2016 Oct 1. – PubMed PMID: 27582279

172. Proteinkinase C delta null mice exhibit structural alterations in articular surface, intra-articular and subchondral compartments [Text] / X. Yang, D. Teguh, J. P. Wu [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2015. – No. 17. – P. 210.

173. Qi YY, Chen X, Jiang YZ, Cai HX, Wang LL, Song XH, Zou XH, Ouyang HW. Local delivery of autologous platelet in collagen matrix simulated in situ articular cartilage repair. *Cell Transplant.* 2019;18(10):1161-9. doi: 10.3727/096368909X12483162197169. Epub 2019 Aug 5. PMID: 19660173.

174. Rabie, A. B. Cbfa1 couples chondrocytes maturation and endochondral ossification in rat mandibular condylar cartilage. [Text] / A. B. Rabie, G. H. Tang, U. Hagg // Arch. Oral Biol. – 2004. – No. 49. – P. 109–118.

175. Randomized controlled trial comparing hyaluronic acid, platelet-rich plasma and the combination of both in the treatment of mild and moderate osteoarthritis of the knee [Text] / J. F. Lana, A. Weglein, S. E. Sampson [et al.] // J Stem Cells Regen Med. – 2016 Nov 29. – No. 12(2). – P. 69–78. – eCollection. – 2016 Nov 29VPubMed PMID: 28096631; PubMed Central PMCID: PMC5227106.

176. Regenerative potential of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokineinhibited chondrogenesis [Text] / C. C. Wu, W. H. Chen, B Zao [et al.] // Biomaterials. – 2011. – No. 32. – P. 5847–5854.

177. Repair of massively defected hemi-joints using demineralized osteoarticular allografts with protected cartilage [Text] / S. Li, X. Yang, S. Tang [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2015. – No. 26. – P. 277.

178. Safety and efficacy of US-approved viscosupplements for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized, saline-controlled trials [Electronic resource] / V. Strand, L. F. McIntyre, W. R. Beach [et al.] // J Pain ResM2015 May 7. – No. 8. – P. 217–228. – URL: <https://doi: 10.2147/JPR.S83076>. Review. – PubMed PMID: 26005358; PubMed Central PMCID: PMC4428363.

179. Sclareol exerts anti-osteoarthritic activities in interleukin-1 β -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. [Text] / Y. Zhong, Y. Huang, M. B. Santoso [et al.] // Int J Clin Exp Pathol. – 2015 Mar 1. – No. 8(3)0. – P. 2365–2374. – PubMed PMID: 26045743; PubMed Central PMCID: PMC4440052

180. Sellam, J. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis [Text] / J. Sellam, F. Berenbaum // Nat Rev Rheumatol. – 2010. – No. 6. – P. 625–635.

181. Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation [Text] / L. Sorokin // Nat Rev. – 2010. – No. 10. – P. 712–723.

182. Swiontkowski, Marc F. MD; Callaghan, John J. MD; Lewallen, David G. MD; Berry, Daniel J. MD. Large Database and Registry Research in Joint Arthroplasty

and Orthopaedics. The Journal of Bone and Joint Surgery: October 19, 2022 - Volume 104 - Issue 20 - p 1775-1777 doi: 10.2106/JBJS.22.00405

183. The Chondrocyte Biology and Clinical Application [Text] / Zhen Lin, Craig Willers, Jiake Xu [et al.] // Tissue Engineering. – 2006. – Vol. 12, No.7. – P. 314–318.

184. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model [Text] / G. Milano, E. Sanna Passino, L. Deriu [et al.] // Osteoarthritis Cartil. – 2010. – No. 18(7). – P. 971–980.

185. The effect of platelet-rich plasma on pain, function, and quality of life of patients with knee osteoarthritis [Text] / S. A. Raeissadat, S. M. Rayegani, M. Babaei [et al.] // Pain Research and Treatment. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 165967. – P. 7.

186. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair [Text] / Y. Mifune, T. Matsumoto, K. Takayama [et al.] // Osteoarthritis Cartil. – 2013. – No. 21(1). – P. 175–185.

187. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair [Text] / Y. Mifune, T. Matsumoto, K. Takayama [et al.] // Osteoarthritis Cartil. – 2013. – No. 21(1). – P. 175–185.

188. The efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review with quantitative synthesis [Text] / A. Khoshbin, T. Leroux, D. Wasserstein [et al.] // Arthroscopy. – 2013. – No. 12. – P. 2037–2048.

189. The efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review with quantitative synthesis [Text] / Khoshbin, T. Leroux, D. Wasserstein [et al.] // Arthroscopy. – 2013. – Vol. 29, No. 12. – P. 2037–2048.

190. The role of synovial macrophages and macrophage produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis [Text] / J. Bondeson, A. B. Blom, S. Wainwright [et al.] // Arthritis Rheum. – 2010. – No. 62. – P. 647–657.

191. The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [Electronic resource] / L. Shen, T. Yuan, S. Chen [et al.] // *J Orthop Surg Res.* – 2017 Jan 23. – No. 12(1). – P. 16. – URL: [https://doi:10.1186/s13018-017-0521-3](https://doi.org/10.1186/s13018-017-0521-3). – PubMed PMID: 28115016; PubMed Central PMCID: PMC5260061.

192. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial [Text] / S. Patel, M. S. Dhillon, S. Aggarwal [et al.] // *Am J Sports Med.* – 2013. – No. 41. – P. 356–364.

193. Treatment of experimentally induced osteoarthritis in horses using an intravenous combination of sodium pentosan polysulfate, N-acetyl glucosamine, and sodium hyaluronan [Electronic resource] / T. J. Koenig, A. J. Dart, C. W. McIlwraith [et al.] // *Vet Surg.* – 2014 Jul. – No. 43(5). – P. 612–622. – URL: [https://doi:10.1111/j.1532-950X.2014.12203.x](https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2014.12203.x). – PubMed PMID: 24819506.

194. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results [Text] / C. Kaps, P. C. Kreuz, G. R. Burmester [et al.] // *Arthritis Research & Therapy.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1186–2180.

195. Trigkilidas, D. The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain [Electronic resource] / D. Trigkilidas, A. Anand // *Ann R Coll Surg Engl.* – 2013 Nov. – No. 95(8). – P. 545–551. – URL: [https://doi:10.1308/003588413X13629960049432](https://doi.org/10.1308/003588413X13629960049432). Review. – PubMed PMID: 24165334; PubMed Central PMCID: PMC4311527.

196. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis [Electronic resource] / A. W. Rutjes, P. Jüni, B. R. da Costa [et al.] // *Ann Intern Med.* – 2012 Aug 7. – No. 157(3). – P. 180–191. – URL: [https://doi:10.7326/0003-4819-157-3-201208070-00473](https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-3-201208070-00473). Review. – PubMed PMID: 22868835.

197. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of the Evidence [Electronic resource] / D. Jevsevar, P. Donnelly, G. A. Brown [et al.] //

J Bone Joint Surg Am. – 2015 Dec 16. – No. 97(24). – P. 2047–2060. – URL: <https://doi: 10.2106/JBJS.N.00743>. Review. – PubMed PMID: 26677239.

198. Yousef, I. Akhtiamov. Staget treatment of knee OA // The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research. 2019, 14 (1). –P.8-14

199. Wu S, Guo W, Li R, Zhang X, Qu W. Progress of Platelet Derivatives for Cartilage Tissue Engineering. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Jun 16;10:907356. doi: 10.3389/fbioe.2022.907356. PMID: 35782516; PMCID: PMC9243565.

200. Zhao D, Pan JK, Yang WY, Han YH, Zeng LF, Liang GH, Liu J. Intra-Articular Injections of Platelet-Rich Plasma, Adipose Mesenchymal Stem Cells, and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Associated With Better Outcomes Than Hyaluronic Acid and Saline in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Network Meta-analysis. Arthroscopy. 2021 Jul;37(7):2298-2314.e10.