

організацію компонентів колінного суглоба – суглобового хряща, менисков і капсули. В умовах тривалого дії – 7 днів, деструктивних і запальних змін в колінному суглобі не виявлено. Іс-
слідований препарат має перевагу перед іншими препаратами антисептиками місцевого дії і може бути використаний в умовах хірургічного лікування суглобів.

Ключевые слова: крысы, коленный сустав, декаметоксин, гистология.

SHORT- AND LONG-TERM EFFECTS OF DECAMETHOXIN (DECASAN®) ANTISEPTIC ON STRUCTURAL COMPONENTS OF THE KNEE JOINT UNDER CONDITIONS OF INTRA-ARTICULAR ADMINISTRATION (EXPERIMENTAL STUDY)

Degtyar V. A., Degtyar A. V., Dedukh N. V., Nikolchenko O. A.

Abstract. The problem of infectious complications in traumatology and orthopedics is still relevant, despite the widespread use of various schemes of antibiotic therapy. In the presence of a periprosthetic infection or arthroscopic intervention, local action antiseptics are important. However, the majority of antiseptics, exerting a bactericidal effect, affect the vital activity of the cells of the surrounding tissues.

The purpose of the study was to determine the effect of local antiseptics of decamethoxin (Decasan®) on the condition of the knee joint in rats.

Object and methods. Two series of experiments were carried out on 20 white laboratory rats: animals were injected into the knee joint with 0.1 ml of physiological saline (control) or 0.1 ml of decasan (0.1 ml of Decasan® solution contains 0.02 mg of decamethoxin) (experience). Animals were killed by overdose of the ether after 1 hour and 7 days after daily administration of the decasan or physiological solution (5 times). The knee joints were examined histologically. The objects of the microscopic examination were articular cartilage on the femoral and tibia, meniscus and capsule of the knee joint.

Results. The structure of the joint components did not differ on the terms 1 and 7 days after the injection of Decasan®. Congruence of articular surfaces is not disturbed. The surface of the articular cartilage is smooth, the zonal organization is preserved, that is, chondrocytes with characteristic phenotypic features form three zones of uncalcified cartilage. In the surface zone, cells have an elongated shape, located in 1-2 balls. Chondrocytes in the intermediate zone have rounded nuclei, located in capsules. Clusters of cells or chondrons are absent. In the deep zone, chondrocytes form columns of 2-3 cells. The matrix was uniformly colored, fibrillation areas were not detected. In calcified cartilage hypertrophied chondrocytes are located in expanded capsules, and there are empty capsules that are characteristic of this zone of articular cartilage. According to the ORSI classification, a similar pattern of articular cartilage is characteristic of the 0 stage, that is, the norm, arthrosis manifestations at the late stage of the study have not been noted. Destructive changes in the cells and matrix in the meniscus and joint capsules were not detected. However, in the case of repeated administration of the physiological solution into the joint cavity, changes are noted in both the articular cartilage and in the synovial membrane. In the articular cartilage in the surface layer, along with chondrocytes with picnotic nuclei, hypertrophied chondrocytes were found due to edema. In the synovial membrane increased density of fibroblasts, significant areas occupy cells of the mononuclear series. That is, there is a chronic inflammatory process.

Conclusion. It has been revealed that Decasan® does not violate the organization of the components of the knee joint – articular cartilage, menisci and capsule. Under the conditions of long-term action – 7 days, destructive and inflammatory changes in the knee joint were not detected. The investigated drug has an advantage over other antiseptic drugs of local action and can be used in the conditions of surgical treatment of joints.

Key words: rats, knee joint, decamethoxin, histology.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.
Стаття надійшла 24.03.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-290-299

УДК 616.71+616.71-018.3]-003.93:616.72-001-031.25:612.08

¹Омельченко Т. М., ¹Бур'янов О. А., ²Дєдх Н. В., ³Лябах А. П., ¹Черновол П. А., ¹Натрус Л. В.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ РЕГЕНЕРАТОРНОЇ МЕДИЦИНИ ПРИ ВНУТРІШНЬО СУГЛОБОВИХ КІСТКОВО-ХРЯЦОВИХ ДЕФЕКТАХ

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (м. Київ)

²ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (м. Київ)

³ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» (м. Київ)

tnomelchenko@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана в межах науково-дослідницької роботи кафедри травматології та ортопедії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця: «Система відновного лікування та реабілітації пацієнтів з наслідками уражень гомілковостопного суглоба», № державної реєстрації 0115U000697, термін виконання 2015-2018 рр.

Вступ. В переважній більшості випадків остеохондральні порушення мають травматичне походження

і виникають сумісно з переломами або ушкодженнями капсульно-зв'язкового апарату суглоба. Внаслідок переважання клінічних симптомів ушкодження кісток або зв'язкового апарату, остеохондральні ушкодження часто залишаються не діагностованими і виявляються в пізніх стадіях, коли консервативне лікування не дозволяє усунути больовий синдром, відновити структуру та функцію ураженого суглоба. При цьому зона кістково-хрящового дефекту поступово

збільшується з прогресуванням деструктивно-дегенеративних процесів в суглобі [1-5].

Сучасний комплекс регенеративних технологій у лікуванні даної категорії пацієнтів включає хірургічні методи в поєднанні зі застосуванням клітинних і тканинних технологій, що сприяє прискоренню проліферації та диференціації клітин ураженої тканини, активації їх метаболізму, створенні умов для відновлення кровопостачання у прилеглий кістковій тканині та оптимізації функціональних умов новоутвореного регенерату. Серед реконструктивно-відновних хірургічних методів, найбільш ефективними є артроскопічний або відкритий дебрідмент, видалення вільних хондральних або остеохондральних тіл, лаваж, проведення абразивної хондропластики (шейверування, вапоризація), мікрофрактуринг або тунелізація кісткової тканини в зоні дефекту, остеохондральна аутоотрансплантація (мозаїчна остеохондропластика) [2-11]. Ефективними методами, що дозволяють стимулювати метаболізм та регенерацію кістково-хрящової тканини, прискорити диференціацію та ріст клітин ушкоджених тканин, прискорити загоєння дефекту, сприяють повноцінній інтеграції кістково-хрящового регенерату до ложа дефекту та зменшують прогресування дегенеративного процесу в суглобі є застосування аутологічної плазми збагаченої тромбоцитами (PRP, platelet rich plasma) та використання мезенхімальних стовбурових клітин (BMDCT, Bone marrow-derived cell transplantation) [7-11]. Дотепер вказані методи широко застосовуються як елементи регенераторної терапії у разі ушкоджень кістково-хрящової тканини, сухожильно-м'язового та капсульно-зв'язкового апарата. Однак недостатня доказова база, щодо впливу даних методів лікування, обумовлює суперечливість поглядів на їх застосування, а також численні дискусії щодо отриманих результатів за використанням зазначених методів лікування [7,9,10,11]. Вищевказане, спонукало нас до проведення експериментального дослідження застосування PRP та BMDCT при лікуванні внутрішньосуглобових остеохондральних пошкоджень.

Мета роботи: за даними морфологічного дослідження в експерименті на лабораторних тваринах оцінити ефективність застосування PRP та BMDCT при лікуванні внутрішньосуглобових остеохондральних ушкоджень.

Об'єкт і методи дослідження. Відповідно до мети дослідження було проведено 4 серії експериментів, які виконані на 32 кролях (жива маса 3800 – 4200 г) по 8 тварин в кожній серії. Вік тварин до початку експерименту був 11-12 місяців [12].

1 серія – контрольні тварини, відтворювали стандартний дірчастий (3 мм) остеохондральний дефект на медіальному виростку стегнової кістки глибиною 5 мм (8 об'єктів дослідження).

2 серія – контрольні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали колагеново-фібриновою матрицею (8 об'єктів дослідження).

3 серія – дослідні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали ауто плазмою збагаченою тромбоцитами (PRP) у колагеново-фібринової матриці (8 об'єктів дослідження).

4 серія – дослідні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали пунктатом кісткового мозку

(BMDCT) у колагеново-фібринової матриці (8 об'єктів дослідження).

У якості матриці використано «Тахокомб» (виробництво Takeda), пластина якого з одного боку виконана колагеном I типу з сухожилку коня, а з іншого боку на колагенову матрицю нанесено ліофілізований людський фібриноген, тромбін, апротинін та рибофлавін.

При контакті колагеново-фібринової матриці з поверхнею дефекту, активується перетворення фібриногена в фібрин, що супроводжується значною адгезією матриці до ложа дефекту. В подальшому відбувається полімеризація фібринового покриття з утворенням еластичного герметичного тканинного каркасу, що закриває дефект. За даними виробника упродовж 4-6 тижнів відбувається повна біодеградація колагеново-фібринової матриці. Асептичні властивості пластини закладені в технологічних процесах її виробництва.

Хірургічне втручання проводили під кетаміновим наркозом (100-150 мг) з місцевою анестезією 0,5% розчином новокаїну. Тварин фіксували на операційному столі. Після підготовки операційного поля скальпелем виконували розріз шкіри передньомедіальної поверхні колінного суглоба. Розсікали м'які тканини, бором відтворювали остеохондральний дефект в медіальному виростку стегнової кістки критичного розміру діаметром 3 мм глибиною 5 мм. Шпинею виконували тунелізацію виростка з дефекту.

Плазму збагачену тромбоцитами отримували наступним чином. В шприц об'ємом 5 мл набирали цитрат (CPDA-1, Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution) об'ємом 0,5 мл. Наступним етапом виконували інтракардіально (до 5 мл) відбір крові. Після цього 0,5 мл отриманої суміші забирали для проведення загального аналізу крові, а іншу частину (4,5 мл) центрифугували (ELMI Centrifuge CM-6 MT, Sky line) за наступним режимом: 1000 обертів за хвилину на протязі 5 хвилин. Після завершення центрифугування виконувалася забір плазми.

Пунктат кісткового мозку отримували шляхом його аспірації з вертлюгової ділянки стегнової кістки кролів в об'ємі 0,5-1 мл.

Тварини всіх серій були виведені з експерименту на 40 добу шляхом введення в одну з вушних вен 0,5-1.0 мл 10% розчину тіопенталу натрію. Вибір цього терміну дослідження для дефектів критичного розміру пов'язаний з тим, що тільки в умовах стимуляції репарації можлива повна регенерація кістково-хрящових структур [12].

Роботу з тваринами виконували відповідно до правил Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин, які використовують для експериментальних та інших наукових цілей [13], а також відповідно до Законодавства України [14]. План експериментальних досліджень був затверджений Комітетом з біоетики при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця від 01.09.2016 р.

На всіх етапах експерименту оцінювали рухову активність кролів, особливості харчування і опороспроможність кінцівки з дефектом. На 1-5 добу тварини берегли кінцівку, а повне навантаження було зафіксовано після 5 діб. На етапах експерименту харчування тварин не було порушено.

Таблиця 1.

Гістологічна оцінка регенерації суглобового хряща в кістково-хрящовому дефекті, стану суглобового хряща та губчастої кісткової тканини навколо дефекту за шкалою оцінки SCRS [16] в нашій модифікації

Досліджені показники	Бали
I. Поверхня: – гладка – з невеликими узорами – нерегулярна	3 1 0
II. Тканини регенерата: гіаліновий хрящ гіаліновий/волокнистий хрящ волокнистий хрящ сполучна тканина	3 2 1 0
III. Розподіл клітин в регенераті колонками колонки/кластери кластери дезорганізація	3 2 1 0
IV. Стан прилегло до дефекту суглобового хряща нормальний нерівномірний розподіл клітин невеликі ділянки матриксу без клітин значні ділянки матриксу без клітин	3 2 1 0
V. Зв'язок регенерату з краями дефекту суглобового хряща. Структурна інтегрованість: повна часткова (50 %) часткова (нжче 50 %) відсутня	3 2 1 0
VI. Субхондральна кістка: нормальна організація підвищене ремоделювання деструктивні зміни/ грануляційна тканина раз'єднання кісткових трабекул, перелом	3 2 1 0

Макроскопічний аналіз стегнової кістки з дефектом проводили після виведення тварин з експерименту в процесі підготовки матеріалу до фіксації.

Гістологічна проводка матеріалу. Кістки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, декальцинували в 5% розчині азотної кислоти, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності (від 60° до 96°), а також в суміші етилового спирту з діетиловим ефіром (у співвідношенні 1:1). Зразки укладали в целоїдин, блоки ущільнювали в густому целоїдині під парами хлороформу. Виготовляли зрізи товщиною 7-10 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином, а також пікрофуксином за ван Гізона [15]. Аналіз і фотографування матеріалу проводили під мікроскопами «AxioStar Plus» і «MICROS». При мікроскопічному аналізі досліджували ділянку дефекту і прилеглу материнську кістку та суглобовий хрящ.

Морфометричний аналіз проводили для визначення характеру та структури регенерату, його інтеграції до оточуючих тканин, оцінки вмісту клітинних структур та неклітинних елементів, що сформувалися в дефекті в різних серіях експерименту з використанням модифікованої шкали рекомендованої Комітетом міжнародної спілки регенерації хряща (SCRS) (табл. 1) [16,17].

Згідно з рекомендаціями SCRS висока оцінка (18) застосовується до результату повної регенерації, тобто формування гіалінового хряща в ділянці дефекту, а найменша оцінка (0) – у разі порушення регенерації. Бали не підсумовуються; кожна градація рахується та порівнюється окремо [16].

Результати дослідження та їх обговорення

1 серія (контроль). За макроскопічним дослідженням ділянка дефекту чітко визначалася у вигляді поглиблення на поверхні суглобового хряща і відсутності блиску в прилеглих до дефекту областях.

На інших віддалених ділянках, суглобовий хрящ мав характерний блиск, порушень будови у вигляді ерозій не було виявлено.

Мікроскопічно крайові відділи суглобового хряща не на всій ширині були спаяні вузькою смужкою регенерату (рис. 1 А, Б). Конгруентність суглобового хряща порушена за рахунок формування поглиблень над ділянкою дефекту. Ділянка травматичного ушко-

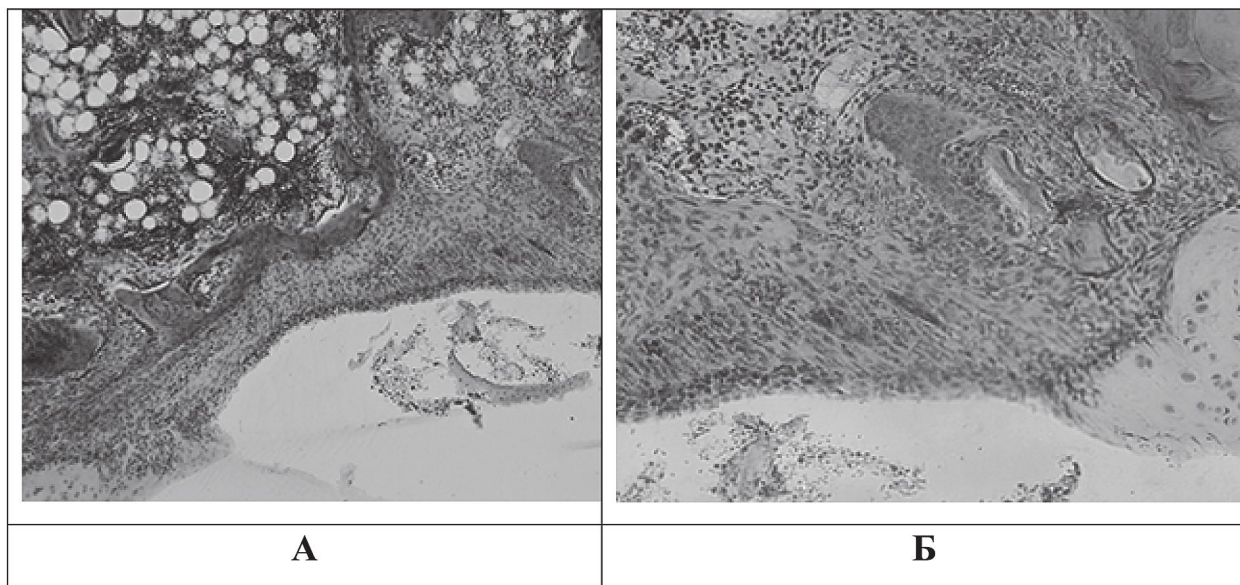


Рис. 1. А) Ділянка кістково-хрящового дефекту, заповнена сполучною тканиною. Гематоксилін та еозин. 36.40. Б) Збільшений фрагмент рис. 1 А. Розширені кровоносні судини. 1 серія. Гематоксилін та еозин. 36. 100.

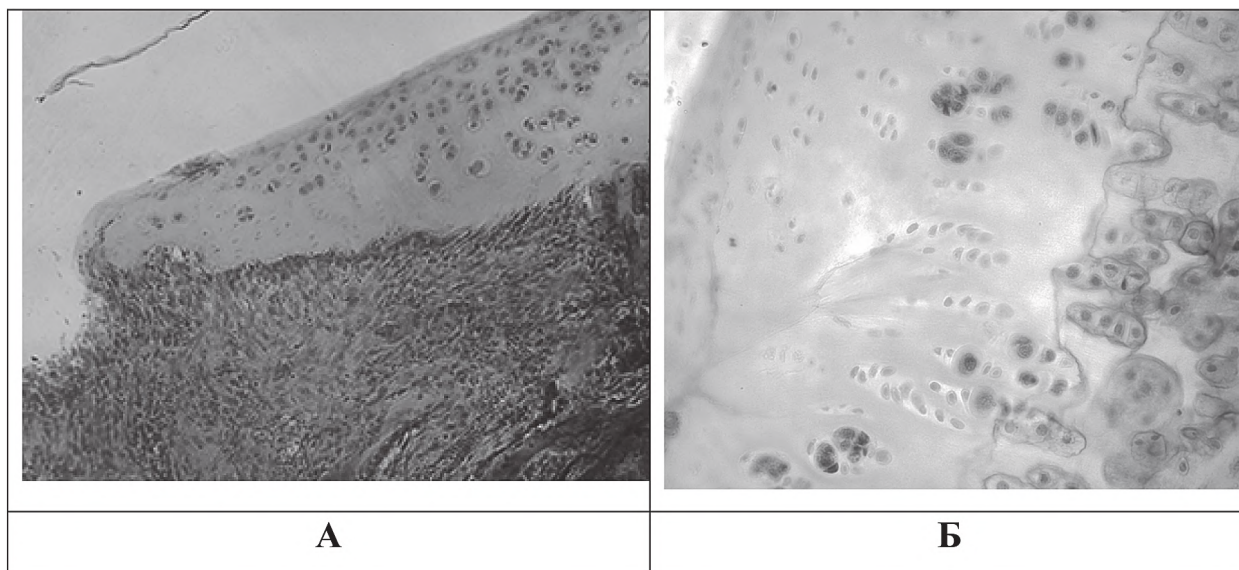


Рис. 2. А. Суглобовий хрящ з низькою щільністю та нерівномірним розташуванням хондроцитів в ділянці, що прилягає до дефекту. Б. Хондроцити з лізисом та пікнозом ядер. 1 серія. Гематоксилін та еозин. А. 3б. 100. Б. 3б. 200.

дження в суглобовому хрящі, що проникає в кісткову тканину, заповнена трьома видами тканин – грануляційною з розширеними кровоносними судинами і незрілими сполучнотканинними клітинами, а також сполучною тканиною з високою щільністю фібробластів, що межувала з невеликими вогнищами волокнистої хрящової тканини (рис. 1 А, Б). Остання розташовувалася в субхондральних ділянках, прилеглих до материнського суглобового хряща.

Сполучна тканина в ділянці дефекту характеризувалася високою щільністю клітин фібробластичного диферона, розташованих серед різноспрямованих пучків колагенових волокон. Клітини мали різну форму ядер – від подовженої до овальної, вони розрізнялися обсягом цитоплазми.

У поверхневому відділі переважали клітини з невеликими округлими базофільними ядрами. Щільність клітин в поверхневій зоні була значно вище, ніж у нижче розташованих ділянках дефекту. Безпосередньо під суглобовим хрящем, прилеглим до

дефекту, виявлено розширені кровоносні судини. У таких ділянках суглобовий хрящ мав низьку щільність хондроцитів із нерівномірним розташуванням. Більшість клітин мали ядра з ознаками пікнозу.

На прилеглих до дефекту ділянках суглобового хряща конгруентність була порушена, великі поля були без хондроцитів або присутні хондроцити з лізисом або пікнозом ядер (рис. 2 А, Б).

Кісткова тканина, що прилягала до ділянки травматичного ушкодження, формувала великопетлясту мережу, що складалася з кісткових трабекул, які розрізнялися товщиною, деякі з них були з мікропереломами. Щільність остеоцитів на поверхні трабекул та остеобластів по їх крайовій поверхні була низькою. Кісткові трабекули, які прилегли безпосередньо до дефекту, на ділянках були без остеоцитів. У глибоких відділах дефекту між кістковими трабекулами виявлено грануляційну тканину з округлими незрілими сполучнотканинними клітинами та високою щільністю судин з розширеними просвітами. У одній твари-

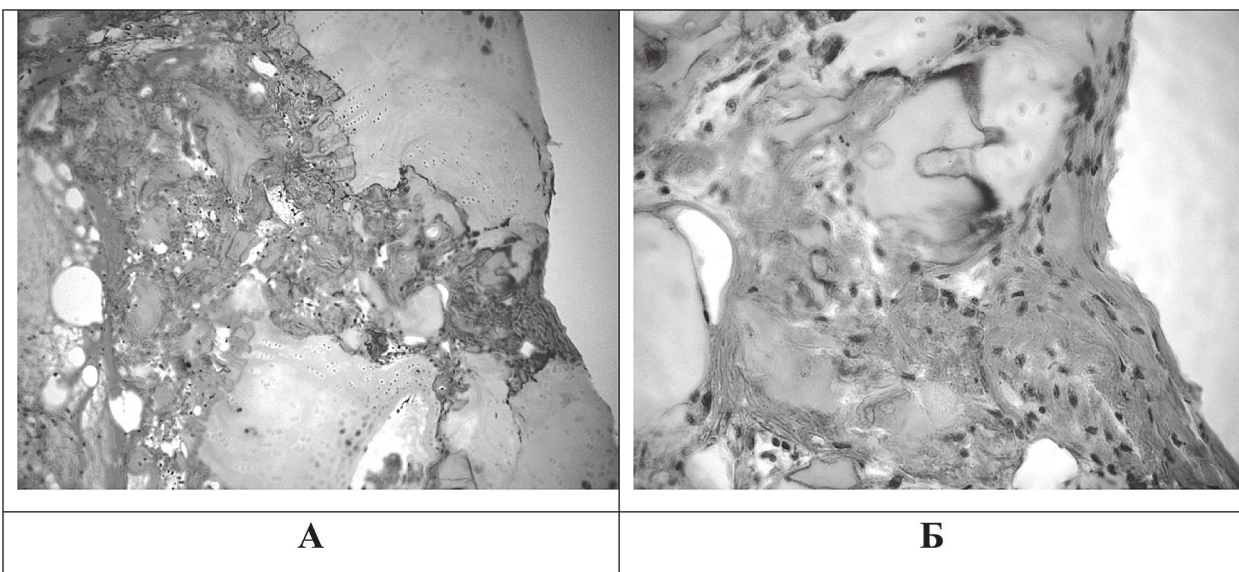


Рис. 3. Ділянка травматичного ушкодження суглобового хряща. А) Поля сполучної тканини, розширені кровоносні судини, кистоподібні порожнини, залишки колагеново-фібринової матриці. Кісткові секвестри. Б) Щільна сполучна тканина в крайовому відділі дефекту з рідко розташованими фібробластами. 2 серія. Гематоксилін та еозин. А) 3б. 100. Б) 3б. 200.

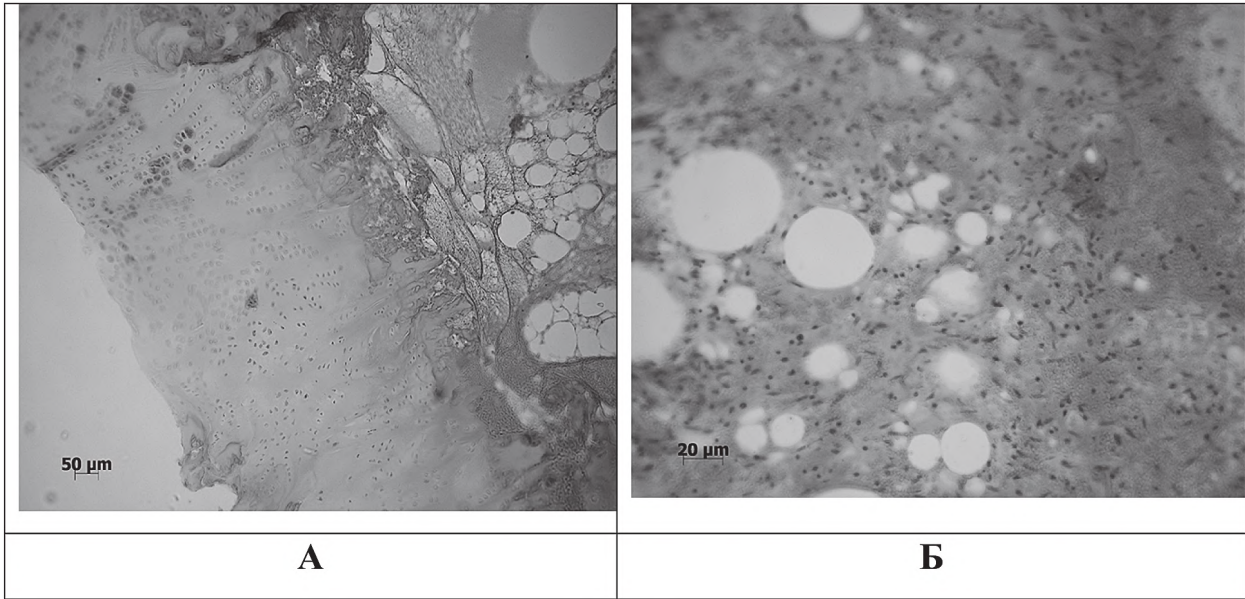


Рис. 4. А) Суглобовий хрящ над ділянкою травматичного ушкодження. Великі ділянки без клітин. Пікноз хондроцитів. Б) Грануляційна тканина в ділянці кісткового дефекту. Розширені кровоносні судини. 2 серія. Гематоксилін та еозин. 36. 100.

ни в зоні дефекту виявлено вузькі поля грануляційної тканини з розширеними кровоносними судинами в глибоких відділах і великі вогнища клітинного і тканинного детриту.

2 серія. *Макроскопічні дослідження.* Ділянка дефекту в суглобовому хрящі чітко визначалась, конгруентність суглобового покриття, прилеглого до дефекту, була порушена, спостерігали втрату характерного блиску.

Мікроскопічні дослідження. Крайові відділи суглобового хряща, що прилягають до відтвореного дефекту, спаяні вузькою смужкою сполучної тканини, що складається з щільних пучків колагенових волокон із рідко розташованими між ними фібробlastами (рис. 3. А, Б).

Губчаста кісткова тканина в зоні травматичного ушкодження з деструктивними змінами кістко-

вих трабекул. Репаративний остеогенез виражений слабо. Виявлено лише осередки остеоїда та кісткові нашарування на поверхні трабекул. В ділянках дефекту виявлено поля грануляційної та пухкої сполучної тканини з тонкими пучками колагенових волокон, поодинокими фібробlastами поміж них та розширеними кровоносними судинами (рис. 4. А, Б). Між сполучною тканиною розташовувалися кісткові секвестри і кістоподібні порожнини з гомогенним вмістом. В дефекті зберігались невеликі фрагменти колагеново-фібринової матриці.

Суглобовий хрящ, що прилягає до ділянки дефекту, на значній території без хондроцитів (рис. 4 А). На відстані від дефекту щільність хондроцитів була низька, більшість клітин мали пікнотичні ядра. В таких ділянках позиційно-специфічна організація, що характерна для суглобового хряща, а саме, роз-

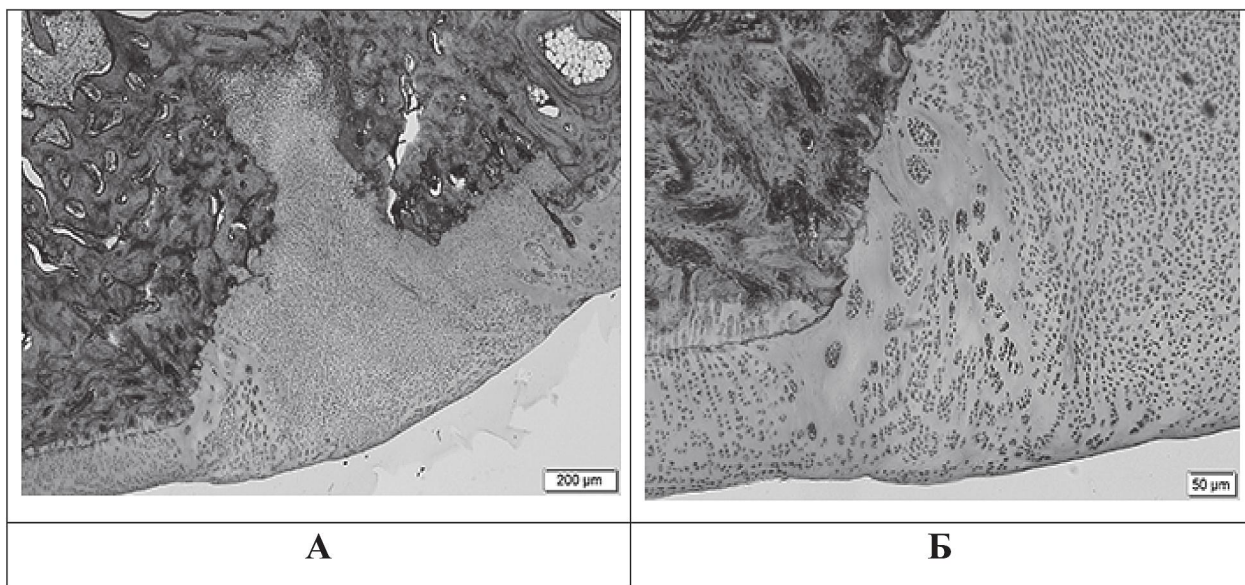


Рис. 5. А) Ділянка дефекту в суглобовому хрящі та губчастій кісткової тканини заповнена хондродом з високою щільністю фіброхондроцитів і хондробlastів. Дрібнопетляста мережа з кісткових трабекул, прилеглих до ділянки травматичного ушкодження. Б) збільшений фрагмент рис. А. Суглобовий хрящ, що прилягає до дефекту з високою щільністю хондроцитів. 3 серія. Гематоксилін та еозин. А) 36. 40. Б) 36. 100.

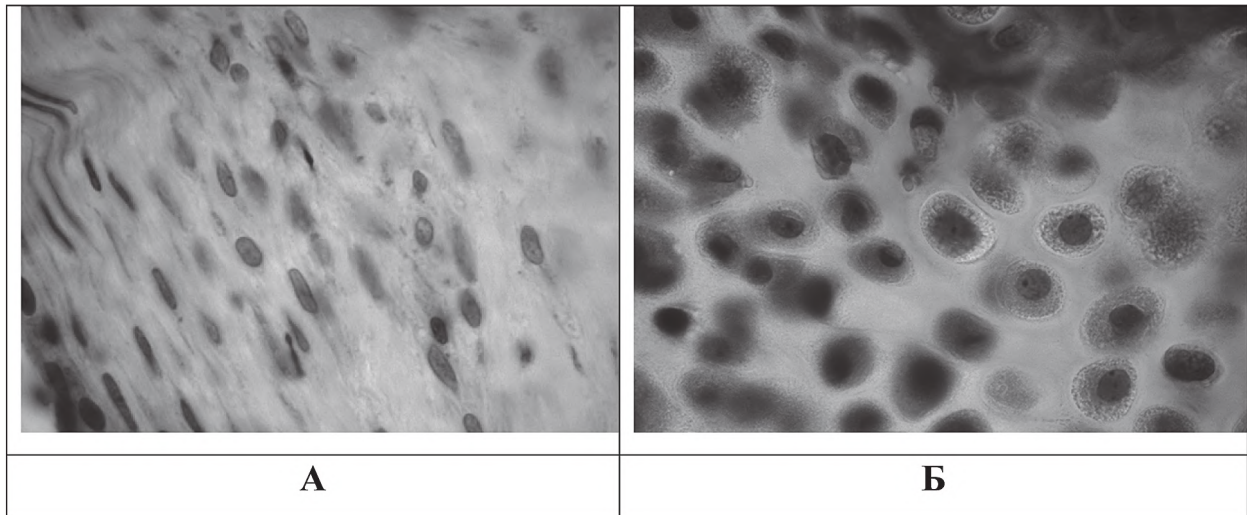


Рис. 6. А, Б. Регенерат в дефекті суглобового хряща. А) Поверхнева зона над дефектом. Фіброхондроцити та хондробласти. Б) Хондробласти та поодинокі хондроцити в глибокій ділянці дефекту. 3 серія. Гематоксилін та еозин. А) Зб. 400. Б) Зб. 1000.

поділ на поверхневу, проміжну та глибоку зони, була порушена.

3 серія. Макроскопічні дослідження. Поверхня суглобового хряща була конгруентна і мала характерний блиск за винятком ділянки дефекту.

За мікроскопічним аналізом в полі зору мікроскопа визначали ділянку травматичного ушкодження, що проходила через суглобовий хрящ та просякала в субхондральну кістку (рис. 5. А, Б). Вона була заповнена гіаліновим хрящем, який щільно контактував з крайовими відділами суглобового хряща, прилеглою субхондральною кісткою та глибше розташованою губчатою кістковою тканиною.

Поверхня, що сформувалася над зоною дефекту, мала рівні контури, складалася з тонких колагенових волокон, між якими були рідко розташовані витягнутої форми фіброхондроцити. Клітини мали витягнуту форму з вузькими базофільно забарвленими ядрами. Щільність клітин в підлеглому гіаліновому хрящі була висока. Виявлено хондробласти, які відрізнялися від фіброхондроцитів округлими або овальними ядрами, що мали чітко окреслені невеликі ядерця (рис. 5 Б). Поодинокі хондроцити були оточені капсулою. Новоутворена хрящова тканина у вигляді гіалінового хряща щільно зрощена з фрагментами суглобового хряща, прилеглими до ділянки травматичного ушкодження, в якій виявлені невеликі території без клітин або хондроцити, котрі формували ізогенні групи. Як поблизу ділянки травматичного ушкодження, так й на відстані від неї, суглобовий хрящ зберігав характерну структурну організацію. У ньому чітко визначалася поверхнева зона, що складалася з декількох шарів хондроцитів, розташованих своєю довгою віссю паралельно поверхні. Колагенові волокна щільно прилягали одне до одного. Ознак їх розшарування не було виявлено.

У проміжній і глибокій зонах суглобового хряща хондроцити зберігали характерне розташування, перебували в капсулах, мали базофільні ядра, оточені вузькою цитоплазмою.

На відстані від зони травматичного ушкодження поверхня суглобового хряща зберігала конгруентність. Структурна організація суглобового хряща на відстані від зони дефекту була не порушена. У по-

верхневій зоні хондроцити мали витягнуту форму, були з характерними видовженими ядрами та довгою цитоплазмою. У проміжній та глибокій зонах суглобового хряща хондроцити мали округлу форму з ядрами, виконаними пухким хроматином. В ядрах клітин були присутні 1-2 ядерця. Клітини розташовувалися в капсулах.

Кісткова тканина, що оточувала ділянку дефекту, була губчатої будови, складалася з кісткових трабекул, що формували дрібнопетлясту мережу. Щільність остеоцитів на поверхні кісткових трабекул була високою.

4 серія. За макроскопічним дослідженням виявлено, що поверхня суглобового хряща була конгруентна. Ділянка дефекту визначалася за відсутністю характерного блиску.

Мікроскопічне дослідження препаратів під світловим мікроскопом показало, що крайові відділи суглобового хряща були щільно з'єднані регенератом у складі якого виявлено гіалінову хрящову тканину, з хондроцитами, що розташовувалися в капсулах та хондробlastами (рис. 6). У складі регенерату переважали хондроцити. Клітини мали гіпохромні округлі ядра (рис. 7 А, Б). Така будова ядра свідчить про їх функціональну активність. Між ними розташовувалися невеликі прошарки фіброхондроцитів з вузькою довгою цитоплазмою. В крайовому відділі дефекту щільність фіброхондроцитів була низькою.

В суглобовому хрящі поряд з дефектом (рис. 8 А, Б) були присутні невеликі ділянки без хондроцитів та ізогенні групи клітин, однак їх щільність була значно нижче, ніж в експериментальних тварин серії № 1 та тварин серії № 2.

На межі між кісткою та новоутвореним хрящем мало місце щільне з'єднання, а у ділянці міжтрабекулярних просторів субхондральної кістки розташовувався прошарок грубоволокнистих кісткових трабекул, що відділяли регенерат. Губчаста кісткова тканина, прилегла до дефекту, була без деструктивних порушень, кісткові трабекули формували щільну мережу. На поверхні трабекул визначена висока щільність остеоцитів, які розташовані в вузьких лакунах.

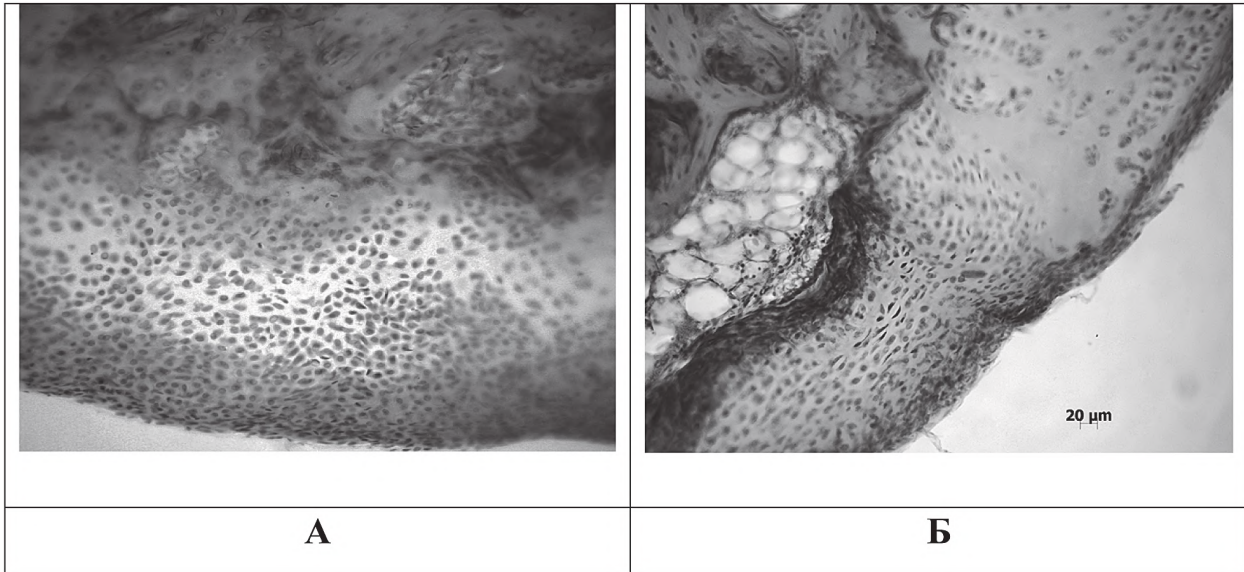


Рис. 7. А, Б. Новоутворена гіалінова хрящова тканина у ділянках дефектів. А. Щільне розташування хондроцитів. Хондроцити з гіпохромними ядрами. Б. Інтеграція регенерата з суглобовим хрящом. 4 серія. Гематоксилін та еозин. А) 36. 100. Б) 36. 200.

Для об'єктивізації даних якісного гістологічного дослідження проведено оцінку стану регенерату, суглобового хряща, що оточував кістково-хрящовий дефект та губчастої кісткової тканини навколо нього (табл. 2).

Аналіз результатів дослідження з використанням модифікованої шкали гістологічної оцінки регенерації суглобового хряща показав, що гіаліновий хрящ переважав тільки в регенераті дослідних тварин серії № 3 та № 4, істотно розшарування поверхні у цих тварин не виявлено, структурна інтегрованість була високою, щільність суглобового хряща навколо країв дефекту значно перевищувала показники контролю. Зв'язок регенерату з краями суглобового хряща, що оточував дефект, досліджували практично на всій площі крайових відділів суглобового хряща. Дегенеративні зміни хондроцитів, в ділянках суглобового хряща, прилеглих до дефекту, переважали у контрольних тварин. Перебудова субхондральної кістки під зоною

дефекту статистично відрізнялася у дослідній та контрольній групами тварин. Шляхом статистичного аналізу проведено порівняння складових шкали морфометричної оцінки в контрольній та дослідних групах та виявлено достовірну різницю за усіма показниками в групах PRP та BMDCT порівняно з контрольними тваринами. Встановлено вірогідну різницю між PRP та BMDCT за показником – тканини регенерату та клітинного складу, у разі використання BMDCT ці показники переважали в 1,4 рази. В порівнянні показників регенерації між серією № 1 та серією № 2 статистично вірогідні відмінності були відмічені в зв'язку регенерата з краями дефекту суглобового хряща, підвищені в серії № 2.

Таким чином, на 32 кролях було відтворено травматичне ушкодження суглобового хряща у вигляді змодельованого повношарового кістково-хрящового дефекту. В контрольній групі тварин (серія № 1) змодельовані дефекти після закінчення термінів

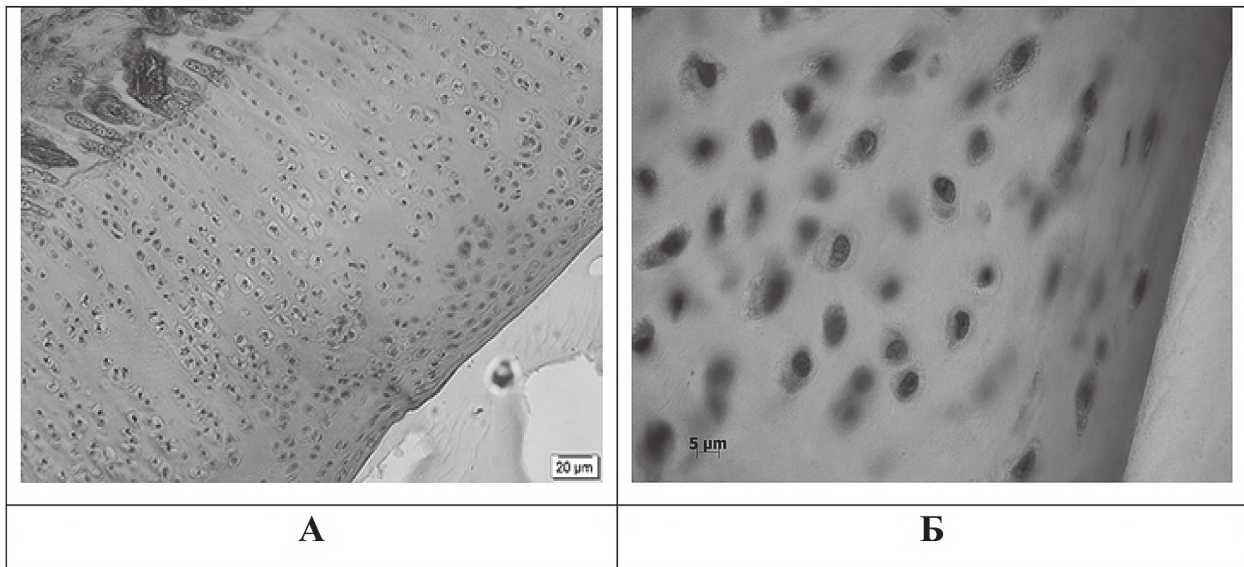


Рис. 8. А, Б. Суглобовий хрящ поблизу ділянки травматичного ушкодження. А) Хондроцити розташовані в капсулах, мають базофільні ядра, оточені вузьким обідком цитоплазми. Б) Поверхнева та проміжна зона суглобового хряща з хондроцитами, що мають гіпохромні ядра. 4 серія. Гематоксилін та еозин. А) 36. 200. Б) 36. 1000.

Гістологічна оцінка (в балах) регенерації суглобового хряща та губчастої кісткової тканини в зоні кістково-хрящового дефекта [16,17] за нашою модифікацією

Досліджені показники	Контроль 1	Контроль 2	PRP	BMDCT
I. Поверхня регенерату	0	0,625±0,18	2,5±0,327	2,75±0,25
Статистична вірогідність			P<0,001	P<0,001 P1>0,05
II. Тканини регенерату	0.375±0.173	0, 5±0,189	1,875±0,295	2,625±0,183
Статистична вірогідність		P2 > 0,05	P<0,001	P < 0,001 P1< 0,05
III. Розподіл клітин в регенераті	0.375±0.183	0,375±0,183	1,25±0,164	1,75±0,164
Статистична вірогідність		P2 > 0,05	P < 0,001	P < 0,001 P1 < 0,05
IV. Стан прилеглого до дефекту суглобового хряща	0	0,25±0,164	1,625±0,183	1,75±0,164
Статистична вірогідність			P < 0,001	P < 0,001 P1 > 0,05
V. Зв'язок регенерата з краями дефекту суглобового хряща. Структурна інтегрованість	0,875±0,125	1,5±0,189	2,75±0,164	2,875±0,125
Статистична вірогідність		P2<0,01	P<0,001	P<0,0 P1>0,05
VI. Субхондральна кістка	0,75±0,164	1,0±0,189	2,5±0,189	2,625±0,183
Статистична вірогідність		P2 >0,05	P<0,001	P<0,001 P1>0,05

Примітка: P – порівняно з контролем 2, P1 – PRP порівняно з BMDCT. P2 – порівняно контроль 1 з контролем 2.

дослідження чітко виявлялися на поверхні, а крайові відділи суглобового хряща були з'єднані вузьким прошарком сполучної тканини. В ділянці губчастої кісткової тканини дефект був заповнений грануляційною та сполучною тканиною. В суглобовому хрящі навколо дефекту, а також у вище та нижче розташованих над дефектом ділянках, виявлено великі території без клітин або поодинокі рідко розташовані хондроцити з пікнозом ядер. В зоні дефекту, що проходить через кісткову тканину, кісткові трабекули, що його оточували, формували великопетлясту мережу з низькою щільністю остеоцитів.

В серії № 2, де застосовували суто колагеново-фібринову матрицю для заповнення дефекта, на 40 добу в зоні травматичного ушкодження суглобового хряща, що проникав в кісткову тканину, визначали грануляційну та фіброзну тканину з високою щільністю фібробластів, що межувала з вогнищами волокнистої хрящової тканини. В субхондральному відділі регенерат представлено кістковими трабекулами, що формували великопетлясту мережу. У дослідній групі тварин серії № 3, які отримували PRP, в ділянці кістково-хрящового дефекту зафіксовано формування гіаліноподібної хрящової тканини з хондробластами, хондроцитами та фиброхондроцитами, які щільно заповнювала кістково-хрящовий дефект. В дослідній групі тварин серії № 4, де застосовували мезенхімальні стовбурові клітини пунктату кістково-мозку, дефекти, що розташовувалися в суглобово-

му хрящі, були заповнені щільною, добре розвинутою гіаліноподібною хрящовою тканиною з високим ступенем її інтеграції до країв дефекту. Кісткові трабекули губчастої кісткової тканини, прилеглої до хрящового дефекту, формували дрібнопетлясту мережу.

За даними експериментальних досліджень, що наведені в літературі, не представлено даних щодо повного відновлення суглобового хряща (тобто, формування структури – поверхневої, проміжної та глибокої зон в хрящу, що некальцифікується, та кальцифікованого хряща з характерним розташуванням хондроцитів). В основному, в літературі є дані, що без втручання в процес регенерації суглобового хряща в ділянках дефекту формується волокнистий хрящ або гіаліновий без характерної позиційної специфічності, яка є характерною для суглобового хряща [18,19,20]. У зв'язку з цим, отримані дані, що під впливом PRP та пунктату кісткового мозку в ділянці остеохондрального дефекту формується гіаліновий або значно наближений

до нього хрящовий регенерат, з відновлення структури субхондральної кісткової тканини, ми розглядаємо як позитивний результат. За даними літератури відомо, що PRP стимулює біосинтез протеогліканів, колагену II типу, а мезенхімальні стовбурові клітини, що містяться в пунктаті кісткового мозку, сприяють адгезії, клітинному забезпеченню зони дефекту, проліферації, диференціюванню хондроцитів [18-21]. Все вищевказане розкриває вплив досліджених регенеративних технологій в аспекті підвищення репаративних потенцій суглобового хряща та співвідноситься з отриманими нами експериментальними даними, що доводить їх високу ефективність.

Висновок. На підставі отриманих експериментальних даних PRP та BMDCT може бути рекомендовано для клінічного застосування при лікуванні пацієнтів з внутрішньосуглобовими остеохондральними пошкодженнями та їх наслідками.

Перспективи подальших досліджень. Проведення гістохімічного аналізу з визначенням формування в ділянці дефекту типів колагену у разі використання PRP та BMDCT.

Література

1. Chodos MD, Schon LC. Osteochondral lesions of the talus: current treatment modalities and future possibilities. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2006;17(2):111-6. DOI: 10.1097/01.bco.0000192893.19886.b2
2. Zengerink M, Struijs PA, Tol JL, Van Dijk CN. Treatment of osteochondral lesions of the talus: a systematic review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2010;18(2):238-46. DOI: 10.1007/s00167-009-0942-6
3. Scranton Jr PE, Frey CC, Feder KS. Outcome of osteochondral autograft transplantation for type-V cystic osteochondral lesions of the talus. *The Journal of bone and joint surgery*. 2006;88(5):614-9. DOI: 10.1302/0301-620X.88B5.17306
4. Anders S, Goetz J, Schubert T, Grifka J, Schaumburger J. Treatment of deep articular talus lesions by matrix associated autologous chondrocyte implantation-results at five years. *International orthopaedics*. 2012;36(11):2279-85. DOI: 10.1007/s00264-012-1635-1
5. Badekas T, Evangelou E, Takvorian M. Treatment of Talar Osteochondral Lesions Using Local Osteochondral Talar Autograft-Long Term Results. In *An International Perspective on Topics in Sports Medicine and Sports Injury*. In Tech. 2012. DOI: 10.5772/26277
6. Evangelou E, Badekas T. Treatment of talar osteochondral lesions using local osteochondral talar autograft mid term results. *Br J Sports Med*. 2011;45(2):e1-e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bjism.2010.081554.59>
7. Van Dijk CN, Reilingh ML, Zengerink M, Van Bergen CJ. Osteochondral defects in the ankle: why painful? *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2010;18(5):570-80. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00167-010-1064-x>
8. Giannini S, Buda R, Faldini C. Surgical treatment of osteochondral lesions of the talus in young active patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(2):28-41. DOI: 10.2106/JBJS.E.00516
9. Giannini S, Buda R, Vannini F. One-step bone marrow derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467:3307-20. DOI: 10.1007/s11999-009-0885-8
10. Mei-Dan O, Carmont MR, Laver L. Platelet-rich plasma or hyaluronate in the management of osteochondral lesions of the talus. *Am J Sports Med*. 2012;40:534-41. DOI: 10.1177/0363546511431238
11. Guney A, Akar M, Karaman I. Clinical outcomes of platelet rich plasma (PRP) as an adjunct to microfracture surgery in osteochondral lesions of the talus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23:2384-9. DOI: 10.1007/s00167-013-2784-5
12. Yoshioka M, Couatts R, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis and cartilage*. 1996;4(2):87-98. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80318-8](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80318-8)
13. Yevropeiska konventsia pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuiutsia dlia doslidnykh ta inshykh naukovykh tsilei. Strasburh, 18 bereznia 1986 roku: ofitsiyniy pereklad [Internet]. Verkhovna Rada Ukrainy. Ofits. veb-sait. Mizhnarodnyi dokument Rady Yevropy. Dostupno: http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137 [in Ukrainian].
14. Verkhovna Rada Ukrainy. Zakon Ukrainy № 3447-IV vid 21.02.2006 «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennia» [Internet]. Kyiv: Vidomosti Verkhovnoi Rady Ukrainy; 2006 [onovleno 2017 Serp. 04; tsytovano 2017 Hrud 11]. Dostupno: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/3447-15> [in Ukrainian].
15. Korzhevskij DE, Gilyarov AV. *Osnovy gistologicheskoy tehniky*. Pb.: SpecLit; 2010. 95 s. Dostupno: <https://elibrary.ru/item.asp?id=21101387> [in Russian].
16. Mainil-Varlet P, Aigner T, Britenberg M, Bullough, Hollander A. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint. Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2003;85-A(2):45-57. DOI: 10.2106/00004623-200300002-00007
17. O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Galloway SH, Fitzsimmons JS. Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue engineering*, 2001;7(3):313-20. Available from: <https://doi.org/10.1089/10763270152044170>
18. Korzh NA, Dedukh NV, Zupanec IA. Osteoartroz: konservativnaya terapiya [monografiya]. Harkov: Zolotyie stranicy; 2007. 424 s. [in Russian].
19. Cugat R, Carrillo JM, Serra I, Soler C. Articular cartilage defects reconstruction by plasma rich growth factors. *Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: current status and prospects*. Bologna, Italy: Timeo Editore; 2006. p. 801-7.
20. Gobbi A, Bathan L. Biological approaches for cartilage repair. *Journal of Knee Surgery*. 2009;22(1):36.
21. Li H, Sun S, Liu H, Chen H, Rong X, Lou J, et al. Use of a biological reactor and platelet-rich plasma for the construction of tissue-engineered bone to repair articular cartilage defects. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(2):711-9. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3380>

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ РЕГЕНЕРАТОРНОЇ МЕДИЦИНИ ПРИ ВНУТРІШНЬО СУГЛОБОВИХ КІСТКОВО-ХРЯЦТОВИХ ДЕФЕКТАХ

Омельченко Т. М., Бур'янов О. А., Дедух Н. В., Лябах А. П., Черновол П. А., Натрус Л. В.

Резюме. В експерименті на 32 лабораторних кролях оцінено ефективність застосування плазми, збагаченої тромбоцитами (PRP, platelet rich plasma) та мезенхімальних стовбурових клітин (BMDCT, bone marrow-derived cell transplantation) сумісно з колагено-фібриновою матрицею при лікуванні внутрішньосуглобових остеохондральних ушкоджень у вигляді повношарового дефекту. У якості контролю досліджували дефект без заповнення та при заповненні виключно колагено-фібриновою матрицею. Гістологічний та морфометричний аналіз проводили для визначення характеру та структури регенерату, його інтеграції до оточуючих тканин, оцінки вмісту клітинних структур та неклітинних елементів, що сформувалися в дефекті в різних серіях експерименту. Аналіз результатів дослідження показав, що гіаліновий хрящ був присутній тільки в регенераті дослідних тварин з використанням PRP та BMDCT, істотного розшарування суглобової поверхні у цих тварин не виявлено. Зв'язок регенерату з краями суглобового хряща, що оточував дефект, досліджували практично на всій площі крайових відділів суглобового хряща. Перебудова субхондральної кістки під зоною дефекту найбільш активно перебігала у дослідних групах тварин. За статистичним аналізом достовірно різницю вищезначених показників в порівнянні з контролем виявлено в умовах застосування PRP та BMDCT. При цьому методика, що передбачає застосування BMDCT виявилася достовірно ефективнішою в порівнянні з застосуванням PRP.

Ключові слова: остеохондральні ушкодження, регенерація хряща, регенеративні технології, PRP (platelet rich plasma), BMDCT (bone marrow-derived cell transplantation).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ РЕГЕНЕРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ ПРИ ВНУТРИСУСТАВНЫХ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТАХ

Омельченко Т. Н., Бурьянов А. А., Дедух Н. В., Лябах А. П., Черновол П. А., Натрус Л. В.

Резюме. В эксперименте на 32 лабораторных кроликах оценена эффективность трансплантации плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP, platelet rich plasma) и мезенхимальных стволовых клеток (BMDCT, bone

marrow-derived cell transplantation) совместно с коллагено-фибриновой матрицей при лечении внутрисуставных остеохондральных повреждений в виде полнослойного дефекта. В качестве контроля исследовали дефект без заполнения и при его заполнении только коллагено-фибриновой матрицей. Гистологический и морфометрический анализы проводили для определения характера и структуры регенерата, его интеграции с суставным хрящом, оценки содержания клеточных структур и неклеточных элементов, сформировавшихся в дефекте в различных сериях эксперимента. Анализ результатов исследования показал, что гиалиновый хрящ присутствовал только в регенерате опытных животных (с использованием PRP и BMDCT), выраженного нарушения суставной поверхности у этих животных не выявлено. Связь регенерата с краями суставного хряща зафиксирована на всей площади. Перестройка субхондральной кости под зоной дефекта наиболее активно протекала в опытных группах животных. Морфометрический анализ показал достоверную разницу вышеуказанных показателей после использования PRP и BMDCT по сравнению с двумя контрольными группами животных. При этом методика, предусматривающая применение BMDCT оказалась достоверно более эффективной по сравнению с применением PRP.

Ключевые слова: остеохондральные повреждения, регенерация хряща, регенеративные технологии, PRP (platelet rich plasma), BMDCT (bone marrow-derived cell transplantation).

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE USE OF REGENERATIVE MEDICINE METHODS FOR INTRAARTICULAR OSTEOCHONDRAL DEFECTS

Omelchenko T., Burianov O., Dedukh N., Lyabakh A., Chernovol P., Natrus L.

Abstract. The modern complex of regenerative technologies in the treatment of patients with intraarticular osteochondral defects includes surgical methods in combination with the use of cellular and tissue technologies, which promotes acceleration of proliferation and differentiation of cells, activation of their metabolism, creation of conditions for the restoration of blood supply in adjacent bone tissue and optimization of functional conditions of the newly formed regenerate. However, the insufficient evidence base on the impact of these treatments (transplantation of PRP, platelet rich plasma and BMDC, bone marrow-derived cell) leads to conflicting views on their use, as well as numerous discussions about treatment outcomes using these treatments.

Purpose of the study. According to the morphological study in an experiment in laboratory animals to evaluate the effectiveness of the use of PRP and BMDCT in the treatment of intra-articular osteochondral injuries.

Object and methods. Experimental studies were performed on 32 rabbits. An osteochondral defect in the medial part of the femur of a critical size with a diameter of 3 mm in a depth of 5 mm was reproduced by the dental boron. The defect was not filled (1st series), filled with collagen-fibrin matrix (2nd series), collagen-fibrin matrix with PRP (3rd series) or with BMDCT (4th series). Animals were killed at 40 days. After histological procedures the material was examined under a microscope Olympus BX 63 and Micros. Morphometric analysis was performed to determine the nature and structure of the regenerate, its integration with surrounding tissues, the evaluation of the content of cell structures and non-cellular elements that were formed in the defect in different series of the experiment using scale recommended by the Committee of the International Cartilage Regeneration Union (SCRS) with our modifications.

Research results and discussion. An analysis of the results of the study using a modified histological evaluation scale showed that hyaline cartilage was present only in the regenerate of experimental animals of series No. 3 and No. 4, they did not show significant stratification of the surface of the cartilage. In the experimental group of animals of the series No. 3 receiving PRP, the formation of hyaline cartilaginous tissue with chondroblast, chondrocytes and fibrochondrocytes, which densely filled the bone and cartilage defect, was recorded in the area of the bone and cartilage defect.

In the experimental group of animals No. 4, where mesenchymal stem cells of the bone marrow punctate were used, defects located in the articular cartilage were filled with a dense, well developed hyaline cartilaginous tissue with a high degree of its integration with the edges of the defect. The bony trabeculae of the spongiform bone adjacent to the cartilaginous defect formed a network.

The comparison of the components of regenerate the morphometric scale in the control and experimental groups was performed and a significant difference was found for all the parameters in the PRP and BMDCT groups compared with the control animals. A statistical difference between PRP and BMDCT was found for the indicator of tissue regenerate and cellular composition, with the use of BMDCT, these indicators prevailed by 1.4 times. Compared with the regeneration indices between the series No. 1 and the series No. 2, statistically significant differences were noted connection of the regenerate with the edges of the articular cartilage defect, elevated in the series No. 2.

Conclusion. In this case, the technique involving the use of bone marrow mesenchymal stem cells (BMDCT) was significantly more effective than using PRP.

Key words: osteochondral damage, cartilage regeneration, regenerative technologies, PRP (platelet-rich plasma), BMDCT (bone marrow cell transplantation).

Рецензент – проф. Ерошенко Г. А.

Стаття надійшла 08.02.2019 року