

УДК 616.728.3-018.3-092.9

Патоморфологические изменения травматических дефектов суставной поверхности мыщелков бедренной кости после имплантации культивированных *ex vivo* аутогенных хондроцитов в эксперименте

В. В. Григоровский¹, С. С. Страфун¹, О. А. Костогрыз¹, Д. А. Зубов²

¹ ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», Киев

² ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев

The purpose of this experimental study was to obtain results of the reparative process and morphometric parameters of articular surface tissues of the knee joint after their mechanical injury and a local implantation of an autochondrocyte (autoCC) culture on a carrying medium. The research was made on 16 rabbits, where a 3.0 mm cylindrical osteochondrous defect of both femoral processes was modelled with receiving of an explant. The osteochondrous explant was used for culturing the autoCC articular cartilage ex vivo during 27–35 days, after that an implantation was performed. It was revealed that a large full-thickness injury of articular surfaces did not restore by itself with formation of a full-fledged hyaline cartilage, but healed according to the type of an incomplete repair, that in terms of arthrology could be determined as progressive osteoarthritis at stages II–IV. Implantation of ex vivo cultured autoCC in the form of columns on a gel carrier into the area of pathological changes in the articular surface without any special fixing apparently did not affect significantly the dynamics of repair of the articular surface damaged, and autoCC themselves died due to necrosis, lysis or apoptosis.

У статті розглянуто результати експериментального дослідження процесу репарації та морфометричні параметри тканин суглобових поверхонь колінного суглоба після їх механічного uszkodження та місцевої імплантації культури автохондроцитів (автоХЦ) на середовищі-носії. Дослідження виконано на 16 кроликах, яким моделювали циліндричний кістково-хрящовий дефект діаметром 3,0 мм обох виростків стегнової кістки з одержанням експлантата. Кістково-хрящовий експлантат використовували для культивування автоХЦ суглобового хряща ex vivo протягом 27–35 діб, після чого виконували імплантацію. Встановлено, що повношарове uszkodження суглобових поверхонь великого розміру самотійно не відновлюється з утворенням повноцінного гіалінового хряща, а заживає за типом неповної репарації, що в термінах артрології може бути визначене як прогресивний остеоартроз II–IV стадій. Імплантація культивованих ex vivo аутоХЦ у вигляді стовпчиків на гелевому носії у ділянку патологічних змін суглобової поверхні за відсутності спеціальної фіксації, вочевидь, істотно не впливає на динаміку репарації uszkodженої суглобової поверхні, а власне аутоХЦ гинуть через некроз, лізис або апоптоз.

Ключевые слова: травматический дефект, суставной хрящ, культивированные аутогенные хондроциты, патоморфологические изменения, эксперимент

Введение

По мнению большинства артрологов, восстановление механически поврежденного или патологически измененного суставного гиалинового хряща (СХ) представляет одну из труднейших задач травматологии и ортопедии [1, 3–5, 9, 15]. Проблема

ма усложняется еще и отсутствием общепринятых критериев оценки степени повреждения и критериев эффекта восстановления СХ после повреждения [21, 22]. Вместе с тем, в последние 10–15 лет во многих странах активно проводят исследования по изысканию способов восстановления СХ в клинике

при наиболее часто встречающихся поражениях и определению показаний к их применению [1, 4, 9, 12, 15].

Восстановлению целостности СХ после острой механической травмы посвящены десятки клинических и экспериментальных исследований, результаты и оценки которых не всегда сопоставимы [1, 9, 15]. Подавляющее большинство авторов считают, что полная регенерация (реституция) гиалинового СХ после острой травмы возможна лишь в случае неглубоких, в пределах толщины хряща, а также небольших по площади (до 2–3 мм) дефектах. Если размеры дефекта относительно площади суставной поверхности значительны (4–5 мм и более) и к тому же дефект костно-хрящевой, т. е. глубокий, полного восстановления гиалинового хряща не происходит, что связано с рядом причин, а заживление дефекта суставной поверхности осуществляется волокнистым хрящом либо фиброзной тканью, либо их сочетанием. В глубоких отделах СХ на месте поврежденной субхондральной костной пластинки образуется эндостальный костный регенерат [16, 22, 23].

Одним из методов улучшения репарации, т. е. заживления после повреждения гиалинового хряща, довольно широко распространенным в настоящее время, является имплантация культивированных *ex vivo* аутогенных (аутоХЦ) [1, 6, 10, 11, 16, 24]. Метод постоянно совершенствуется в отношении условий культивирования клеток, техники фиксации их в участке повреждения, условий послеоперационного ведения больных [1, 8, 9, 15, 22]. Проводят также сравнительное изучение результатов применения различных методов оптимизации репарации СХ в эксперименте и клинике, одним из которых является имплантация аутоХЦ [6, 13, 16, 24].

Вероятно, пока нет четких показаний для применения ряда методов оптимизации репарации СХ, сохраняется актуальность дальнейших экспериментальных и клинических исследований.

Целью настоящего экспериментального исследования было определить результаты процесса репарации и морфометрические параметры тканей суставных поверхностей коленного сустава после их механического повреждения в условиях местной имплантации культивированных аутоХЦ в трехмерном носителе.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 16 кроликах (начальная масса 3,2 кг), которым под кетаминным наркозом проводили хирургические вмешательства на тканях коленного сустава. Переднебоковым доступом выполняли артротомию, полым сверлом диаметром 3,0 мм с режущим краем формировали цилиндрический костно-хрящевой дефект обоих мыщелков бедренной кости с получением эксплантата. После гемостаза рану зашивали. Костно-хрящевой эксплантат использовали для культивирования аутогенных хондроцитов суставного хряща *ex vivo* в течение 27–35 суток, после чего выполняли имплантацию (табл. 1).

Хондроциты получали из биоптатов суставного гиалинового хряща кролика посредством трехчасовой последовательной ферментативной дезагрегации в растворах проназы, 100 ед/мл («Sigma», США) и коллагеназы типа IA, 100 ед/мл («Sigma», США). Изолированные из хрящевого матрикса клетки высевали на пластиковые флаконы площадью 75 см² («Corning», США) и культивировали до образования монослоя в ростовой среде DMEM/F12 («Sigma», США) с добавлением 10 % эмбрио-

Таблица 1. Распределение экспериментально-морфологического материала по группам сравнения, срокам наблюдения и локализации объектов исследования

Варианты экспериментальных воздействий (группы животных)	Сроки и периоды наблюдения, сутки	Количество коленных суставов	Объекты морфологического исследования (локусы)		
			Мыщелки бедра	Мыщелки большеберцовой кости	Всего объектов по группам и срокам
Травматический костно-хрящевой дефект суставной поверхности без последующих воздействий («Дефект»)	105	1	2	—	2
	187	2	4	2	6
Травматический костно-хрящевой дефект суставной поверхности с последующей имплантацией аутоХЦ («Дефект+аутоХЦ»)	45–75	2	4	—	4
	146–156	7	14	8	22
	188	4	8	—	8
	209	3	6	4	10
Интактный контралатеральный сустав («Интакт»)	181	1	2	—	2
	215	3	6	—	6
	240	3	6	—	6
Всего объектов исследования разных локализаций		26	52	14	66

нальной телячьей сыворотки («Биолот», Россия) в CO₂-инкубаторе («Jouan», Франция) при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % содержанием CO₂. При пассировании культур использовали 0,25 % раствор трипсина и ЭДТА («Биолот», Россия) в соотношении 1:5 (рис. 1).

Культированными аутоХЦ кролика два пассажи импрегнировали 1 % полимеризующийся раствор агарозы VII типа («Sigma», США) в растворе Хэнкса («Биолот», Россия). Полимеризацию агарозы с клетками проводили при комнатной температуре в стерильных инсулиновых шприцах, затем полученные цилиндры нарезали на диски диаметром 0,5 см и толщиной 0,2–0,5 см. Полученные агарозно-клеточные диски транспортировали к месту трансплантации в растворе Хэнкса. Столбики агарозы длиной 4 мм и диаметром 2 мм (объем 12,6 мм³) с заключенными в них аутоХЦ в концентрации 10⁷/мл носителя имплантировали с легким прижатием в дефекты суставных поверхностей после осторожного кюретажа дна и стенок костно-хрящевых дефектов. Суставную капсулу коленного сустава герметично зашивали. Некоторым животным костно-хрящевой дефект суставных поверхностей оставляли без последующей имплантации аутоХЦ (группа сравнения). После операций животных содержали в обычных условиях вивария.

Кроликов выводили из эксперимента передозировкой тиопентала натрия в различные сроки наблюдения (табл. 1), считая от дня имплантации аутоХЦ, затем вычленили конечности, где были произведены хирургические вмешательства и некоторые интактные. Выполняли рентгенографию суставных концов в двух проекциях. Объектами гистологического исследования с различными патологическими изменениями и сроками наблюдений были суставные концы бедренной и реже большеберцовой костей, вырезанные во фронтальной плоскости. Использовали суставные концы костей, в которых рентгенологически и макроскопически отмечали патологические изменения. По характеру моделируемой патологии было выделено три основные группы: «дефект», «дефект+аутоХЦ», «неповрежденные».

Фрагменты коленных суставов фиксировали в 10 % формалине, разрезали на кусочки с максимальным сохранением топографии, декальцинировали в 5 % растворе азотной кислоты и заливали в целлоидин. Гистологические срезы толщиной 10–12 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также гематоксилином и пикрофуксином по Ван-Гизон. Гистологические исследования проводили на микроскопах «Olympus CX-41» и МБС-2, циф-

ровые микрофотографии выполняли на микроскопе «ЛЮМАМ-Р8» цифровой зеркальной камерой «Canon EOS 300D».

Результаты и их обсуждение

Наиболее выраженные морфологические изменения после экспериментальной травмы наблюдали в мышечках бедренной кости. Рентгенологически отмечали незначительную деформацию мышечков бедренной и большеберцовой костей, остеосклероз субхондральных отделов спонгиозы мышечков и краевые костные разрастания неоднородного строения (рис. 2). В отдельных случаях деформация суставного конца бедренной кости была значительной, что рентгенологически соответствовало картине остеоартроза (ОА) III–IV ст., причем пораженным оказывался не только дистальный конец бедренной кости, но и проксимальный конец большеберцовой.

Патоморфологические изменения в суставных концах при создании дефекта, без имплантации аутохондроцитов. Через 105 суток после воспроизведения дефекта суставной поверхности в обоих мышечках СХ был неравномерно истончен, отмечали выраженную дистрофию хрящевого матрикса. Патологические изменения в СХ преобладали в участках, расположенных по внешним краям мышечков, т. е. вблизи медиальной и латеральной поверхностей эпифиза (рис. 3). Через 187 суток после повреждения мышечков патологические изменения суставных поверхностей выражены слабо: в медиальном мышечке — истончение СХ, разволокнение его поверхностной зоны, поверхность СХ латерального мышечка слегка деформирована, со стороны межмышечковой впадины на поверхности СХ латерального мышечка располагался тонкий фиброзный паннус.

Патоморфологические изменения в суставных концах при создании дефекта в условиях имплантации аутохондроцитов, культивированных *ex vivo*. 45–75-е сутки после имплантации аутоХЦ. Патологические изменения в обоих случаях, относящихся к этому периоду, различались. В одном случае (45 суток) оба мышечка бедра были изменены примерно в равной степени: нормальный СХ практически отсутствовал и был замещен уплотненной фиброзной тканью неоднородного строения и волокнистым хрящом, субхондральная костная пластинка деформирована; в медиальном мышечке имелось щелевидное углубление, образованное нависающим хрящевым регенератом — участок соответствовал ранее образованному дефекту суставной поверхности (рис. 4). В другом случае, в медиальном

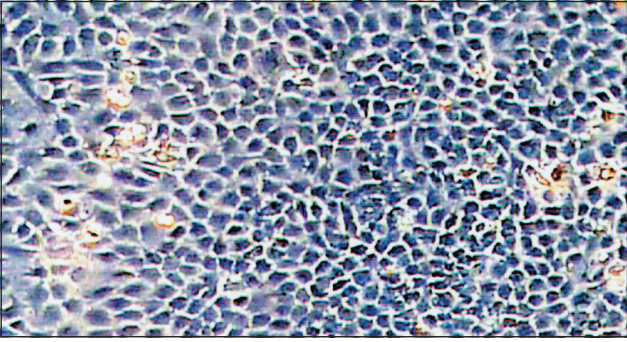
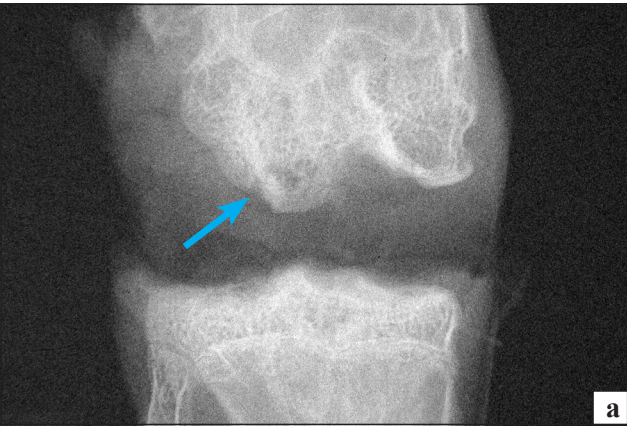
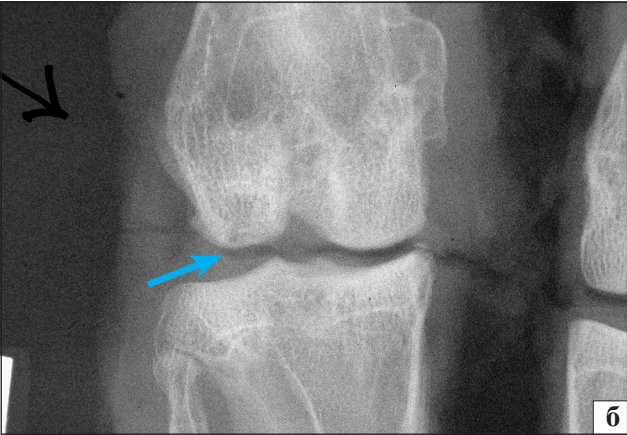


Рис. 1. Конфлюентная культура хондроцитов гиалинового хряща кролика, 1 пассаж, фазово-контрастная микроскопия, ув. 100



а



б



в

Рис. 2. Фото рентгенограммы коленного сустава крысы. Посттравматический гонартроз мыщелка бедра (место травмы указано стрелкой). 187 суток после создания дефекта суставной поверхности (а); 146 (б) и 209 (в) суток после имплантации аутоХЦ

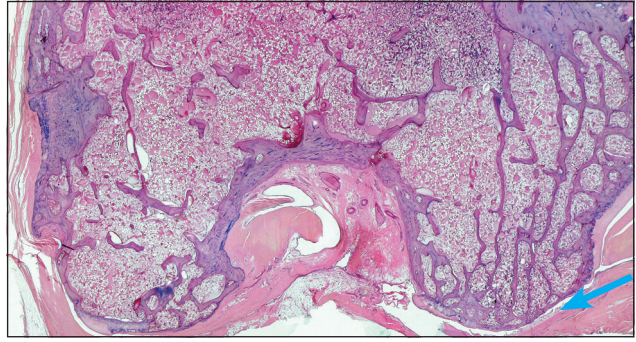


Рис. 3. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Значительное истончение СХ на суставных поверхностях, преобладающее во внешних отделах мыщелков (стрелка). 105 суток после нанесения дефекта. Гематоксилин и эозин, ув. 12



Рис. 4. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Замещение дефекта суставной поверхности мыщелка фиброзной тканью и волокнистым хрящом; углубление (стрелка) с нависающим хрящевым регенератом. 45 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и пикрофуксин по Ван-Гизон, ув. 30

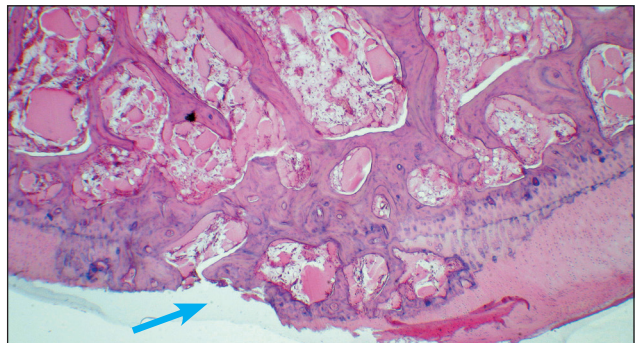


Рис. 5. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Участок деструкции СХ мыщелка с островком патологического окостенения на месте дефекта (стрелка). 75 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 30

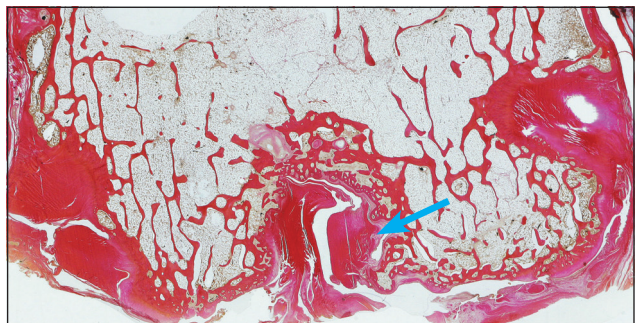


Рис. 6. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Замещение дефекта суставной поверхности фиброзной тканью (стрелка). Выраженный остеосклероз субхондральной костной ткани. 156 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 30

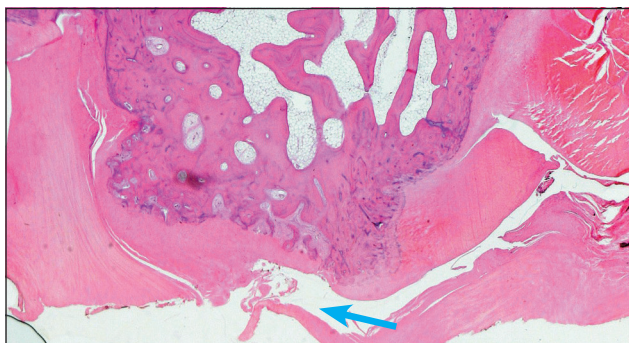


Рис. 7. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Участок замещения гиалинового хряща фиброзной тканью и волокнистым хрящом (стрелка) на суставной поверхности мышелка. 146 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 24



Рис. 8. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Замещение дефекта суставной поверхности — участка СХ и субхондральной спонгиозы (стрелка) фибро-жировой тканью. 146 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 24

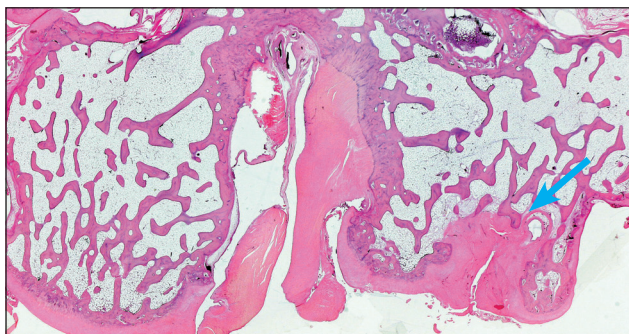


Рис. 9. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Микрокиста (стрелка) с миксоидным содержимым в основании дефекта суставной поверхности мышелка, замещенного волокнистым хрящом. 146 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 24

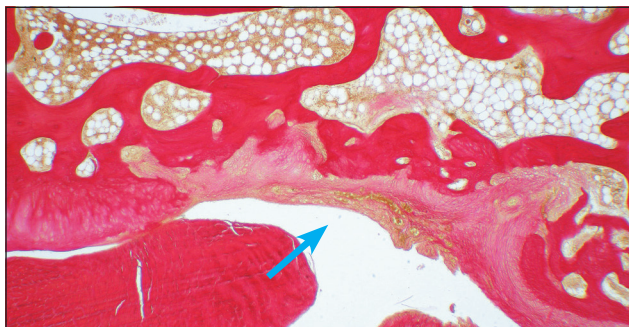


Рис. 10. Микрофото гистопрепарата. Дефект гиалинового СХ латерального мышелка бедра (стрелка), замещенный фиброзной тканью и волокнистым хрящом. 188 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и пикрофуксин по Ван-Гизон, ув. 30

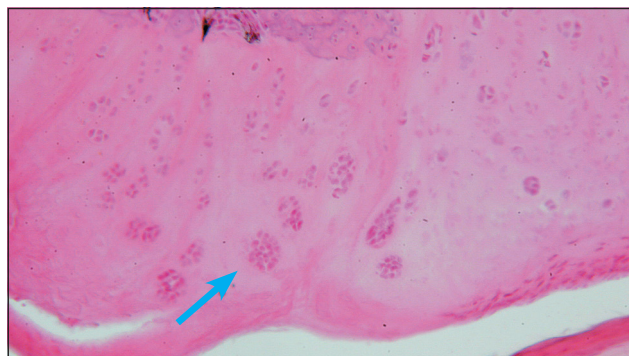


Рис. 11. Микрофото гистопрепарата. Крупные изогенные группы пролиферирующих ХЦ (стрелка) в участке суставного хряща, прилежащего к дефекту. 188 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 80

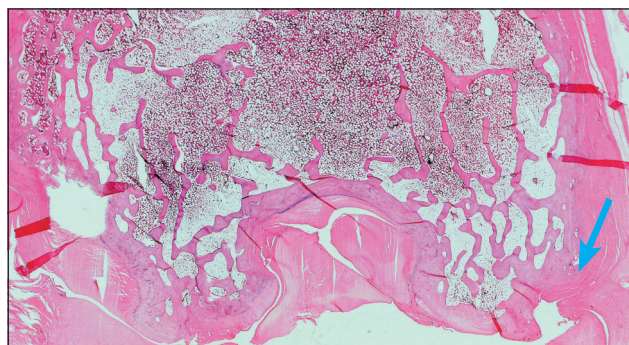


Рис. 12. Микрофото гистопрепарата. Замещение дефекта суставной поверхности мышелка фиброзной тканью (стрелка); другой мышелок лишен СХ, остеосклероз субхондральной кости. 188 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 12

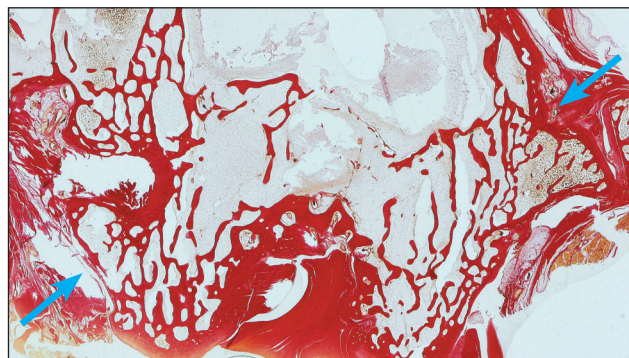


Рис. 13. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Выраженная деформация суставного конца бедра с краевыми костными разрастаниями (стрелка). 209 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и пикрофуксин по Ван-Гизон, ув. 10

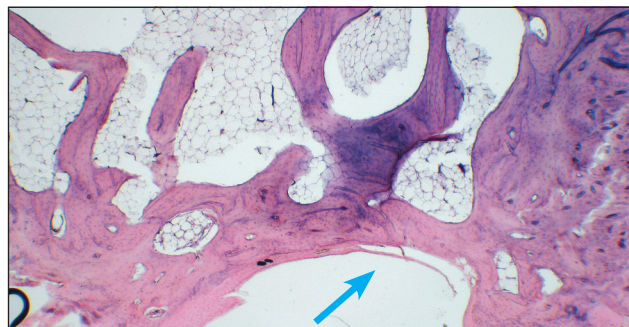


Рис. 14. Микрофото гистопрепарата дистального конца бедренной кости. Дефект СХ (стрелка) мышелка бедра покрыт фиброзной тканью; субхондральная костная пластинка восстановлена. 209 суток после имплантации аутоХЦ. Гематоксилин и эозин, ув. 40

мышцелке определяли участок деструкции СХ с дистрофическим обызвествлением, проявляющимся смещением базофильной линии в сторону суставной поверхности с наличием участка патологического окостенения (рис. 5).

146–156-е сутки после имплантации аутоХЦ. Патологические изменения в мышцелках бедренной кости, отмеченные во всех случаях наблюдения, локализовались в обоих мышцелках бедра, однако степень их проявления варьировала. Более выраженные изменения регистрировали в латеральных мышцелках: суставная поверхность была деформирована, покрыта неравномерно истонченным СХ, замещенным на участках уплощенным волокнистым хрящом и/или фиброзной тканью, что соответствовало ОА II–III ст. (рис. 6, 7). Место дефекта было покрыто слоем фиброзной ткани. В смежных участках СХ выявляли некротизированные хондроциты в виде плотных эозинофильных комочков. В одном из наблюдений в полости дефекта суставной поверхности располагалась васкуляризованная фиброзно-жировая ткань с небольшими островками костной (рис. 8). В трех случаях в субхондральной спонгиозе либо в более глубоких отделах мышцелков обнаружены серозные кисты диаметром 1 и 3 мм (рис. 9). В то же время в участках СХ и костномозговой полости, прилежащих к дефекту суставной поверхности, встречались группы пролиферирующих хондроцитов (ХЦ). Патологические изменения тканей мышцелков бедренных костей в большинстве случаев соответствовали ОА II–III ст.

188-е сутки после имплантации аутоХЦ. На суставных поверхностях мышцелков контурировались места сформированных дефектов СХ в виде углублений, заполненных грануляционной или незрелой фиброзной тканью, и/или волокнистым хрящом (рис. 10). В некоторых дефектах образовавшийся хрящ был разволокнен, имел ворсинчатый характер; в краях дефекта СХ обнаружены гиперцеллюлярные изогенные группы пролиферирующих ХЦ (рис. 11). В одном случае в латеральном мышцелке суставного конца на месте травмы сохранялся дефект СХ, заполненный фиброзной тканью (рис. 12) и единичными хондроцитами.

209-е сутки после имплантации аутоХЦ. На медиальных мышцелках обнаруживали патологические изменения, соответствовавшие гонартрозу II (чаще), III или III–IV стадий. Суставная поверхность была деформирована, в субхондральной костной пластинке наблюдали остеосклероз, по краям — реактивные костные или костно-хрящевые разрастания (рис. 13). Дефекты суставных поверхностей имели вид небольших углублений, которые покрывал тонкий слой

фиброзной ткани. В этих участках субхондральная костная пластинка была в состоянии остеосклероза (рис. 14). В одном случае структурные изменения медиального мышцелка бедренной кости соответствовали гистологической картине гонартроза III ст.: максимальные изменения локализовались на месте дефекта, частично заполненного тонким слоем фиброзной ткани, с очаговым остеосклерозом субхондральной костной пластинки.

Патоморфологические изменения в суставных концах контралатеральных конечностей. Из 8 мышцелков, относящихся к данной группе наблюдений, лишь в 2 (сроки 181-е и 240-е сутки после имплантации аутоХЦ) отмечены дистрофически-деструктивные изменения, соответствовавшие I–II стадиям гонартроза: местами зафиксировано уменьшение толщины СХ в пределах промежуточной зоны, изредка — участки разволокнения и демаскирования коллагеновых волокон, вертикальные щели, микрокисты. В 6 мышцелках (5 — из дистальных эпиметафизов бедра и 1 — из проксимального мышцелка эпиметафиза большеберцовой кости) патологических изменений не обнаружено.

Градации показателей состояния суставных концов костей, образующих коленный сустав. Поскольку выраженность морфологических изменений суставных концов в разных группах наблюдения варьировала, с целью объективизации результатов исследования мы провели квантификацию степени поражения структур мышцелков. Оценивание степени выраженности дистрофически-деструктивных изменений в тканях суставных концов проведены в соответствии с четырехстадийной классификацией ОА [1]. Были учтены некоторые особенности развития дистрофически-деструктивного поражения мышцелков бедренной и большеберцовой костей после создания травматических дефектов суставных поверхностей у кроликов, где сравнительно редко наблюдается полная деструкция СХ с обнажением, остеосклерозом и своеобразной «шлифовкой» субхондральной кости, а обычно участки деструкции гиалинового хряща замещаются фиброзной тканью и/или волокнистым хрящом.

Патологические изменения суставных поверхностей разных мышцелков одного и того же суставного конца бедренной кости в нашем материале различались по степени выраженности, т. е. соответствовали гонартрозу разных стадий (I–IV), поэтому дать однозначную гистологическую оценку во многих случаях было затруднительно. Для статистической обработки градационных характеристик пораженных суставов их оценивали отдельно и при выводе средних параметров стадии поражения для одной

Таблица 2. Средние параметры выраженности дистрофически-деструктивных изменений в тканях суставных концов кроликов в различных группах экспериментов

Сроки и периоды наблюдения после имплантации аутоХЦ, сутки	Варианты экспериментальных воздействий (группы объектов сравнения), число оценок, статистические характеристики				Результаты статистических сравнений средних параметров между группами наблюдений
	«Дефект», бедренные кости	«Дефект + аутоХЦ», бедренные кости	«Интакт»: сочленяющаяся большеберцовая	«Интакт»: контралатеральная бедренная	
45–75	–	3 3,33 ± 0,167 (в серии — два кролика)	–	–	Разница средних отсутствует ←
105	2 3,50 ± 0,00 (в серии один кролик)	–	–	–	
146–156	–	14 2,00 ± 0,25	7 2,00 ± 0,476	–	
181–187–188	2 1,00 ± 0,00 (артроз у одного кролика из двух)	7 2,29 ± 0,286	2 1,00 ± 0,00 (в серии один кролик)	2 2,25 ± 0,25 (в серии один кролик)	Разница между группами «дефект + аутоХЦ» и «интакт» большеберцовая недостоверны при имеющемся числе наблюдений ←
209–215	–	6 2,67 ± 0,42	3 1,00 ± 0,00 (в серии два кролика)	Все мышелки без признаков гонартроза	Разница между группами «дефект + аутоХЦ» и «интакт» большеберцовая недостоверны при имеющемся числе наблюдений ←
240	–	–	–	2 1,25 ± 0,75 (артроз у одного кролика из трех)	
Результаты статистических сравнений по срокам наблюдения →	↑ При имеющемся числе наблюдений различия между средними величинами периодов 45–75-е и 209–215-е сутки, 146–156-е и 181–188-е, 181–188-е и 209–215-е недостоверны. Между средними величинами периодов 45–75-е и 146–156-е сутки, 45–75-е и 181–188-е — достоверны, $p < 0,05$				

Примечание. В ячейках таблицы указаны число оценок (мышелков), средняя арифметическая, ошибка средней

серии параметры суммировали как отдельные наблюдения, т. е. число n — не число животных, а число оцениваемых объектов (мышелков) по показателю стадии гонартроза (от I до IV). Строение мышелков, где признаки хотя бы I стадии гонартроза не обнаружены, расценивали как отсутствие при-

знака дистрофически-деструктивного поражения и не включали в статистическую обработку как отдельные варианты (табл. 2). В наиболее репрезентативной группе экспериментов «дефект + аутоХЦ» можно судить о динамике средних параметров показателя «стадия ОА»:

- уже через 45–75 суток (1,5–2,5 мес) после имплантации аутоХЦ (сроки после повреждения суставных концов примерно на месяц больше) ОА достигал значительной степени (средний параметр стадии более 3);
- в более поздние сроки (5–7 мес после имплантации) средние параметры стадии ОА колебались от 2 до 3;
- статистически достоверные различия в группе «дефект + аутоХЦ» были установлены лишь для отдельных серий, для других серий этой группы различия средних оказались недостоверными (при имеющемся числе наблюдений);
- оценка межгрупповых различий средних параметров оказалась доступной лишь для серий некоторых периодов наблюдений (181–188-е и 209–215-е сутки) и, учитывая ограниченность объема наблюдений, свидетельствуют о значительно большей выраженности средних параметров ОА в группе «дефект + аутоХЦ» по сравнению с параметрами для большеберцовой кости, сочленяющейся с поврежденными мышечками бедренной кости.

Патогистологическое исследование тканей коленных суставов кроликов, у которых воспроизвели крупные костно-хрящевые дефекты суставных поверхностей мышечков, показало, что в пределах сроков наблюдения (от 2,5 до 9 мес) восстановление суставной поверхности не происходит — ни в форме реституции СХ, ни в форме субституции. К тому же, в отдельных случаях не возмещался дефект субхондральной костной пластинки — на этом месте персистировал дефект неправильной формы. Имплантация культивированных аутоХЦ в условиях данного эксперимента не привела к заметной оптимизации репарации суставной поверхности. В обеих группах сравнения в поврежденных суставных концах уже через 2,5–4,5 мес развивались патологические изменения, отражавшие неполноценную репарацию компонентов суставной поверхности и соответствовавшие выраженному гонартрозу. Результаты гистологического исследования не дали определенного ответа на вопрос об участии культивированных аутоХЦ в формировании хрящевых регенератов, хотя слабо выраженные пролиферативные изменения в краях дефектов СХ все же выявлены: наряду с некрозом хондроцитов обнаруживали гиперцеллюлярные изогенные группы-кластеры. Подобные ограниченные пролифераты ХЦ встречаются в СХ суставов больных при I и II стадиях (чаще) ОА, обычно сочетаются с хондронекрозами и не приводят к адекватному замещению поврежденного СХ [1, 4]. В генезисе дистрофиче-

ски-деструктивных изменений, вероятно, играет роль длительная перегрузка контралатерального сустава [4, 9].

Большинство авторов, изучавших в эксперименте возможность регенерации гиалинового СХ после его механического повреждения, отмечают ограниченный потенциал восстановления структуры СХ, что связано как с недостаточностью пролиферации, так и с нарушением синтетической функции ХЦ. А это приводит к существенным отличиям биохимического состава хрящевого матрикса от нормального и, в свою очередь, обуславливает функциональную недостаточность формирующихся регенератов. Научные публикации посвящены не только клеточным источникам регенерата, но и условиям пролиферации ХЦ и образования матрикса *in vivo* [1, 3, 5, 9, 15, 21, 22].

Среди условий регенерации поврежденного СХ некоторые авторы рассматривают количество имплантируемых аутоХЦ [8, 20], считая, что минимальная концентрация введенных аутоХЦ должна быть $10^7/\text{см}^3$, т. е. такой, которую мы использовали. Увеличение стартового количества имплантируемых аутоХЦ на 2–3 порядка приводит к увеличению итогового количества хондроцитов в месте имплантации [20]. Впрочем, итоговое количество хондроцитов, вероятно, зависит от многих факторов, сочетание которых нельзя считать полностью изученным [1, 8, 9]. Можно предположить, что оптимальным для регенерации СХ в условиях выполненного нами эксперимента было бы количество имплантируемых аутоХЦ, превышающее $10^7/\text{см}^3$.

Репаративная регенерация СХ — процесс, имеющий различные аспекты, среди которых потенциальные клеточные источники регенерации, их свойства и количество, необходимые для оптимального замещения дефекта, динамика пролиферации и дифференцировки ХЦ, особенности синтетической активности (формирование матрикса определенного биохимического состава), степень интеграции регенерата с краями резидентного СХ, оценка структурно-функциональной полноценности суставной поверхности с образовавшимся на месте дефекта регенератом [7, 13, 23]. Проблема усложняется еще и тем, что травмированный СХ, не будучи своевременно подвергнут специальной хирургической обработке и замещению, обычно в большей или меньшей степени и на различном протяжении постепенно дегенерирует, ХЦ некротизируются, матрикс претерпевает дистрофические изменения с более-менее распространенной деструкцией, т. е. формируется патологическое состояние, определяемое как ОА II–IV стадии [1, 7, 9, 15, 21].

Тенденции развития такого научного направления, как разработка и усовершенствование способов биологического восстановления поврежденных суставных поверхностей, в последние годы связаны с использованием «высоких» биологических технологий — клеточной и тканевой инженерии, методов культивирования ауто- и аллоХЦ, мультипотентных стромальных клеток костного мозга, включая жировой, тонких приемов фиксации культивированных *ex vivo* клеточных пролифератов к поверхностям дефектов и т. п. Все это предполагает достаточно высокий технологический уровень практики — современную оснащенность лабораторий, адекватную подготовку персонала, соблюдение стандартов в оценке показаний к применению и результатов. Так, в исследовании *in vitro* определено значение добавки трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) для усиления реэкспрессии хондроцитарного фенотипа, т. е. особенностей синтеза культивированными аутоХЦ хрящевого матрикса определенного биохимического состава [10]. Изучение в эксперименте экспрессии генов белков хрящевого матрикса в культуре ХЦ кролика на альгинате и топографии регенерации СХ с применением флуоресцентного мечення ХЦ показало, что количество имплантированных жизнеспособных аутоХЦ в течение 4 недель снижалось от 100 % до 15 %, а интеграции аутоХЦ в регенерирующую ткань резидентного хряща не наблюдали [19]. В эксперименте на козах установлено, что результат пластики костно-хрящевыми имплантатами дефектов суставной поверхности зависит от сроков выполнения их замещения: свойства восстановленного СХ при назначении лечения в ранние сроки уступали интактному, но превосходили регенерат при выполненном спустя несколько недель замещении либо при отсутствии лечения [23].

Методами иммуногистохимии и гибридизации *in situ* на клиническом материале от больных установлено, что имплантированные аутоХЦ способны продуцировать тканеспецифические коллагены матрикса гиалинового хряща [7, 11]. При этом в отдельных работах отмечена значительная повреждаемость ткани эксплантатов СХ при вырезании костно-хрящевых фрагментов, что проявляется хондронекрозами почти на трети площади поверхностной зоны СХ и может повлиять на интеграцию имплантата и реконструкцию СХ [14]. Рандомизированное сравнительное исследование результатов пластики дефектов СХ аутоХЦ и мозаичными костно-хрящевыми имплантатами подтвердило преимущества применения аутоХЦ [6], а МРТ рассматривается как лучший сегодня визуализирующий метод кли-

нической оценки результатов имплантации аутоХЦ [12]. В некоторых работах дается более высокая оценка методу замещения дефектов суставной поверхности костно-хрящевыми цилиндрами по сравнению с пластикой аутоХЦ [13]. Отдельные авторы оценивают результаты применения метода микропереломов пораженной суставной поверхности по клиническим и гистологическим данным как сравнимые с пластикой дефектов аутоХЦ [16]. Для восстановления больших участков дегенеративно измененного СХ предложены комбинации пластики аутоХЦ и перемещения остеохондрального аутотрансплантата. При этом у большинства больных через 3 года после имплантации наблюдали интеграцию пересаженных столбиков с краями окружающего резидентного СХ [24].

Выводы

Крупноочаговое полнослойное повреждение суставных поверхностей мышелков бедренных костей кроликов, приводящее к образованию цилиндрического костно-хрящевого дефекта, самостоятельно не восстанавливается с образованием полноценного гиалинового хряща, а заживает по типу неполной репарации, что в терминах артрологии может быть определено как прогрессирующий ОА II–IV стадий.

Дефект СХ замещается фиброзной тканью различной степени зрелости и волокнистым хрящом, длительно персистирует в виде углубления с участками вторичной патологической оссификации, а субхондральная костная пластинка регенерирует и подвергается остеосклерозу либо в ней длительно сохраняется дефект.

В ткани суставного хряща, перифокальной к травматическому дефекту суставной поверхности, наблюдается хондронекроз, дистрофия хрящевого матрикса и ограниченная пролиферация ХЦ резидентного СХ, количественно недостаточная для полноценного закрытия дефекта.

Дистрофически-деструктивные изменения суставных поверхностей, хотя и с меньшей частотой и степенью выраженности, чем в поврежденном мышелке, развиваются также в суставных концах костей, сочленяющихся с пораженной, а также в суставных концах костей контралатеральной конечности, но относительно редко.

Имплантация культивированных *ex vivo* аутоХЦ в гидрогелевом носителе в участки дефекта суставной поверхности при отсутствии специальной фиксации с резидентным СХ, по-видимому, существенно не влияет на динамику процессов репарации крупного очага повреждения суставной поверхности, а сами аутоХЦ подвергаются некрозу,

лизису или апоптозу. Возможно, одним из факторов, необходимых для обеспечения оптимальных условий посттравматической регенерации СХ, является стартовое количество аутоХЦ, имплантируемых на носителе в дефект суставной поверхности.

Список литературы

1. Регенерация суставного хряща / Н. В. Дедух, С. В. Малышкина, В. А. Радченко и др. // *Остеоартроз: консервативная терапия* / под ред. Н. А. Коржа, Н. В. Дедух, И. А. Зупанца. — Харьков: Золотые страницы, 2007. — С. 87–134.
2. Дедух Н. В. Скелетные ткани / Н. В. Дедух, Е. Я. Панков // *Руководство по гистологии*. — СПб: СпецЛит, 2001. — Т. 1. — С. 284–336.
3. Лаврищева Г. И. Кость и хрящ / Г. И. Лаврищева, Л. Н. Михайлова // *Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. Руководство* / под ред. Д. С. Саркисова. — М.: Медицина, 1987. — С. 154–185.
4. Павлова В. Н. Репаративные потенции хряща / В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева // *Хрящ* / В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева, Л. И. Слуцкий, Г. Г. Павлов. — М.: Медицина, 1988. — С. 191–196.
5. Хэм А. Гистология / А. Хэм, Д. Кормак. — М.: Мир, 1983. — Т. 3. — С. 136–162.
6. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee / G. Bentley, L. C. Biant, R. W. J. Carrington et al. // *J. Bone Joint Surg.* — 2003. — Vol. 85-B, № 2. — P. 223–230.
7. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee / T. W. R. Briggs, S. Mahroof, L. A. David et al. // *J. Bone Joint Surgery.* — 2003. — Vol. 85-B, № 7. — P. 1077–1083.
8. Articular Cartilage Engineering with Autologous Chondrocyte Transplantation: A Review of Recent Developments / M. Brittberg, L. Peterson, E. Sjogren-Jansson et al. // *J. Bone Joint Surgery.* — 2003. — Vol. 85-A, Suppl. 3. — P. 109–115.
9. Buckwalter J.A. Articular Cartilage. Part II: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation / J. A. Buckwalter, H. J. Mankin // *J. Bone Joint Surg.* — 1997. — Vol. 79-A, № 4. — P. 612–632.
10. Autologous chondrocyte implantation. Culture in a TGF- β -containing medium enhances the reexpression of a chondrocytic phenotype in passaged human chondrocytes in pellet culture / A. J. Goldberg, D. A. Lee, D. L. Bader, G. Bentley // *J. Bone Joint Surg.* — 2005. — Vol. 87-B, № 1. — P. 128–134.
11. Molecular and immunohistological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation / B. Grigolo, L. Roseti, L. de Franceschi, A. Piacentini et al. // *J. Bone Joint Surg.* — 2005. — Vol. 87-A, № 1. — P. 46–57.
12. Prospective clinical Study of autologous chondrocyte implantation and correlation with MRI at three and 12 months / I. J. P. Henderson, B. Tuy, D. Connell et al. // *J. Bone Joint Surgery.* — 2003. — Vol. 85-B, № 7. — P. 1060–1066.
13. Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in Cartilage Repair of the Knee Joint. A Prospective, Comparative Trial / U. Horas, D. Pelinkovic, G. Herr et al. // *J. Bone Joint Surg.* — 2003. — Vol. 85-A, № 2. — P. 185–192.
14. Chondrocyte Death Associated with Human Femoral Osteochondral Harvest as Performed for Mosaicplasty / J. S. Huntley, P. G. Bush, J. M. McBirnie et al. // *J. Bone Joint Surg.* — 2005. — Vol. 87-A, № 2. — P. 351–360.
15. Hunziker E. B. Articular Cartilage Repair / E. B. Hunziker, L. Rosenberg // *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology* / Ed. W. J. Koopman. — 13-th ed. — Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. — Vol. 2. — P. 2027–2038.
16. Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee. A Randomized Trial / G. Knutsen, L. Engebretsen, T. C. Ludvigsen, J. O. Drogset // *J. Bone Joint Surg.* — 2004. — Vol. 86-A, № 3. — P. 455–464.
17. Repair of defects in articular joints. Prospects for Material-Based Solutions in Tissue Engineering / A. K. Lynn, R. A. Brooks, W. Bonfield, N. Rushton // *J. Bone Joint Surg.* — 2004. — Vol. 86-B, № 8. — P. 1093–1099.
18. Autogenous Osteochondral Morselised Grafts for Full Thickness Osteochondral Defects in the Knee Joints of Pigs / A. Mahadev, D. P. Mahara, P. Chang et al. // *Singapore Med. J.* — 2001. — Vol. 42, № 9. — P. 410–416.
19. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells / C. M. Mierisch, H. A. Wilson, M. A. Turner et al. // *J. Bone Joint Surg.* — 2003. — Vol. 85-A, № 9. — P. 1757–1767.
20. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices / W. C. Puelacher, S. W. Kim, J. P. Vacanti et al. // *Int. J. Oral Maxillofacial Surg.* — 1994. — Vol. 23, № 1. — P. 49–53.
21. Redman S. N. Current Strategies for Articular Cartilage Repair / S. N. Redman, S. F. Oldfield, C. W. Archer // *European Cells and Materials.* — 2005. — Vol. 9, № 1. — P. 23–32.
22. Articular Cartilage Repair / R. L. Sah, A. C. Chen, S. S. Chen et al. // *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology* / Ed. W. J. Koopman. — 14-th ed. — Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. — Vol. 2. — P. 2264–2280.
23. Saris D. B. F. Joint Homeostasis. The discrepancy between old and fresh defects in cartilage repair / D. B. F. Saris, W. J. A. Dhert, A. J. Verbout // *J. Bone Joint Surg.* — 2003. — Vol. 85-B, № 7. — P. 1067–1076.
24. The treatment of osteochondral lesions using a combination of autologous chondrocyte implantation and autograft. Three-year follow-up / J. R. Sharpe, S. U. Ahmed, J. P. Fleetcroft, R. Martin // *J. Bone Joint Surg.* — 2005. — Vol. 87-B, № 5. — P. 730–735.