

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ ТРАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ НАМН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТКАЧУК ПАВЛО ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

УДК: 616.72-007.2-018.1"712.4":001.891.5(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ
КЛІТИННІ ТА ТКАНИННІ ТЕХНОЛОГІЇ В ЛІКУВАННІ
ОСТЕОАРТРОЗУ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

14.01.21 – травматологія та ортопедія

222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ П.В. Ткачук

Науковий керівник: Страфун Сергій Семенович, член-кореспондент
НАМН України, доктор медичних наук, професор

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Ткачук П.В. Клітинні та тканинні технології в лікуванні остеоартрозу (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 14.01.21 «Травматологія та ортопедія» (222 – Медицина). – ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, 2023.

Дисертація присвячена порівняльному дослідженню впливу клітинних технологій (синонім – регенеративних технологій) на розвиток остеоартрозу. Актуальність теми не викликає сумнівів, оскільки пошкодження колінного суглобу і розвиток остеоартрозу посідає друге місце після травматизації тазостегнового суглобу і призводить до тривалої непрацездатності. Консервативне лікування захворювання супроводжується лише тимчасовим полегшенням, не попереджає прогресування патологічного процесу і потребує оперативного лікування. Первинне біомеханічне ушкодження вважається основним чинником розвитку остеоартрозу. Гострі і хронічні пошкодження структур суглобу індукують розвиток місцевої патологічної запальної реакції, що призводить до дистрофічних змін структурних утворень хряща та появи прогресуючої деструкції суглобової поверхні. Аналіз патогенезу остеоартрозу дозволив визначити основні ланки розвитку захворювання та розробити експериментальну модель, яка максимально відповідає клінічним випадкам з травматичним деформуючим остеоартрозом.

Наступний етап роботи полягав у дослідженні впливу введених у колінний суглоб збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП), клітин аспірату кісткового мозку та жирової тканини. Обрані підходи клітинної терапії є перспективними напрямками у лікуванні різних захворювань, зокрема в травматології, тому дослідження їх ефектів дії є необхідними для розуміння механізмів регенеративного впливу та ефективності.

Для реалізації поставлених завдань роботи було проведено

експериментальне дослідження. Його об'єктом став колінний суглоб кроликів через 1,5 і 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу. На основі аналізу літературних джерел, які присвячені дослідженню травматичних пошкоджень колінного суглобу, було модифіковано модель артрозу та отримано Патент України № 130791 на корисну модель. Запропонована експериментальна модель полягає у поєднанні двох залежних патогенетичних чинників: травматичного дефекту зв'язкового апарату, супутнього та ішемічного пошкодження тканин. Для цього, кроликам здійснювали перетин медіальної зв'язки для зміни фізіологічної біомеханіки суглоба. Додатково створювали дефект суглобової поверхні великогомілкової кістки, задля травматичного пошкодження суглоба. Термічну травму капсули суглоба викликали шляхом коагуляції судин. Це супроводжувалось порушенням регіонального кровообігу. Пошкодження колінного суглобу призвело до нестабільності та порушення його біомеханіки. Окрім того, виникали прогресуючі структурні зміни компонентів суглобу. За морфологічними критеріями ці зміни оцінювались, як II стадія захворювання.

Гістологічними методами було встановлено прогресуюче пошкодження суглобового хряща великогомілкової кістки та зроблено кілька ключових заключень про розвиток остеоартрозу. Перше з них полягає у тому, що перетин медіальної зв'язки викликає нестабільність і змінену біомеханіку колінного суглоба. Додаткове фокальне механічне пошкодження ініціює прогресуючу деформацію суглобового хряща. На морфологічному рівні дегенеративні зміни даної структури проявляються у зменшенні його товщини. Порушення не обмежуються зоною травматичного дефекту і прогресують на первинно непошкоджені ділянки суглобової поверхні. В основі цих змін лежать дистрофія хондроцитів гіалінової хрящової тканини, загибель і редукція клітинного складу хряща, поява безклітинних лакун у хондромукоїді. На основі аналізу характеру розвитку пошкодження суглобового хряща, прийшли до висновку, що дегенеративні зміни починаються від поверхневих дрібноклітинних шарів хрящової тканини. Редукція клітинного складу

прогресує радіально від зони дефекту. Структурні зміни, після перетину медіальної зв'язки з ініціацією пошкодження поверхні суглобового хряща, оцінено як II стадію остеоартрозу.

Друге заключення полягає у тому, що моделювання порушеної біомеханіки колінного суглоба з локальним пошкодженням його хряща, позначається на структурних змінах інших клітинних утворень. Так, гістологічно підтверджено розвиток дистрофічних змін менісків та капсули суглоба. На мікроскопічному рівні тіло менісків представлене гіаліновою хрящовою тканиною, як і суглобові поверхні. Тому морфологічні прояви пошкодження менісків були подібними до вищезазначених. Зокрема, виявлено дистрофію і загибель ізогенних груп хондроцитів, деструктивні зміни хондромукоїду та пошкодження судин меніска. Зміни у менісках пов'язані із порушеною біомеханікою колінного суглоба. Остання виникла внаслідок перетину медіальної зв'язки, розвитку запалення у колінному суглобі та порушенні регіональної мікрогемодинаміки.

Третє заключення – комбіноване травматичне і термічне пошкодження капсули колінного суглоба разом з перетином медіальної зв'язки, викликають фіброзні зміни у зовнішньому шарі капсули та дистрофічні порушення синовіальної оболонки. Порушення мікроциркуляції проявляється гіперемією та некрозом кровоносних судин, інфільтрацією лейкоцитів. Зміни судин капсули були неоднорідними та залежали від ангіоархітекtonіки капсули. Так, у фіброзному шарі переважно виникають реакції стазу дрібних артерій та вен, а у ворсинках синовіальної оболонки часто мали місце дистрофічні зміни мікросудин. При цьому, пошкодження ворсинок прогресувало від 1,5 до 2,5 місяців після пошкодження, а появу фокальної проліферації фібробластів у синовіальній оболонці оцінено, як структурні прояви прогресуючих фіброзних змін у стінці капсули від зовнішніх її шарів, до внутрішніх. На основі встановлених дистрофічних змін ворсинок, можна пояснити патогенез порушень синтезу й обміну синовіальної рідини при даному захворюванні.

Четверте заключення – пошкодження суглобового хряща з супутнім

запальним процесом позначаються на щільності субхондральної кісткової тканини. Зменшення щільності кісткових трабекул з дистрофічними змінами глибоких шарів хряща пояснюються кількома причинами. Мова йде про появу порожніх лакун, прогресуюче пошкодження епіфіза великогомілкової кістки, що розповсюджується від зони дефекту, внаслідок нестабільності суглоба та зміни його біомеханіки після перетину медіальної зв'язки. При цьому, щільність субхондральної кістки обернено пропорційно залежить від ступеня запального процесу в суглобі.

Результати гістологічних досліджень засвідчили мультифокальність структурних змін та їх прогресуючий характер у колінному суглобі при моделюванні II стадії остеоартрозу. Зроблено висновок, що синовіальна оболонка капсули, меніски і суглобовий хрящ є тими мішенями, які потребують трофічної підтримки та активації ендogenous механізмів регенерації. У зв'язку з цим, зазначені структурні утворення були детально досліджені після введення у суглоб деяких клітинних суспензій.

Застосування ЗТП сприяло збереженню ворсинок синовіальної оболонки та вистилки капсули суглобу. Одночасно, осередки геморагічної пенетрації у підсиновіальному шарі вказували на порушення мікроциркуляції, що потребує додаткового терапевтичного впливу. Аналіз гістологічної будови менісків показав захисний вплив ЗТП щодо матриксу хряща тіла менісків. В той же час, дистрофічні зміни хондроцитів також було виявлено. Це свідчить про обмежену трофічну підтримку даного лікувального засобу. Одночасно з цим, статистично значуще збільшилась товщина перифокальної зони епіфізарного хряща, в середньому на 18,2 %, порівняно з групою з остеоартрозом ($p < 0,05$). Скупчень тромбоцитів у просвіті капсули, через 1 місяць після введення, не виявлено, що вказує на їх тотальну деструкцію і нетоксичність такого терапевтичного засобу для лікування остеоартрозу.

Після введення у колінний суглоб аспірату клітин кісткового мозку було встановлено деякі важливі ознаки відновного процесу. Головне заключення полягає у тому, що через 1 місяць після введення клітинного аспірату

зберігаються осередки ретикулярної тканини з клітинами гемопоетичного ряду (бластні форми). Морфогенез цих осередків супроводжується додатковим ангиогенезом, а також їх інтеграцією з синовіальною оболонкою та сполучною тканиною менісків. Це сприяло збереженню менісків та синовіальної оболонки, зокрема, щільності та довжини їх ворсинок. Проте, на жаль, вираженого пригнічення дистрофічних змін хрящової тканини суглобової поверхні великогомілкової кістки встановлено не було. Це пояснюється важким пошкодженням та розвитком дегенеративних змін хрящової тканини, а також її слабким потенціалом до репаративної регенерації.

Введення у колінний суглоб аспірату жирової тканини характеризувалось формуванням осередків адипоцитів у порожнині капсули та їх інтеграції з синовіальною оболонкою. Водночас, спостерігалась поява окремих клітин у підсиновіальній зоні. Але новоутворені осередки жирової тканини не сприяли істотному збереженню суглобового хряща. Морфометрична оцінка не показала статистично значущої різниці між показниками товщини хряща, порівняно з групою з остеоартрозом (хоча спостерігалася тенденція до збільшення щільності ізогенних груп). Морфогенез пухкої сполучної тканини навколо меніска було оцінено, як прояв репаративної регенерації.

У порівняльному плані, застосування клітин кісткового мозку та жирової тканини, переважно, але не ЗТП, позначилось на процесах регенерації синовіальної оболонки та менісків суглобу. Пригнічення розвитку деструктивних змін і резорбції кісткових трабекул у епіфізарній ділянці відбувалось при застосуванні ЗТП й аспірату кісткового мозку. Відносна щільність кісткової тканини на 11,7 % і 15,6 % ($p < 0,05$) зростала, у порівнянні з дослідним показником. А при введенні аспірату жирової тканини, можна було спостерігати лише тенденцію до подібної позитивної дії. Зроблено висновок про те, що ступінь пошкодження епіфізарної кістки залежить від обсягу розвитку запального процесу у суглобі та наявності запальної інфільтрації у субхондральній зоні. Мова йде про процес, що відбувається в лакунах губчастої кістки, де локалізований кістковий мозок. Відсутність дії клітин жирової

тканини на субхондральну кісткову тканину пов'язана з появою запальної інфільтрації і є негативним наслідком такого впливу.

З метою дослідження наслідків розвитку ішемічного та запального пошкодження тканин, при моделюванні II стадії остеоартрозу, було проведено біохімічне дослідження. У роботі було обрано показники, які безпосередньо пов'язані із запальним процесом: активність лейкоцитарної еластази, мієлопероксидази, параоксонази-1, а також церулоплазмину, продуктів окисної модифікації білків та ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів), відновного глутатіону та ферментів антиоксидантного захисту (каталази та супероксиддисмутази (СОД)). Результати біохімічних досліджень показали зміни, які призводять до накопичення цитотоксичних продуктів окисної модифікації при патологічному процесі. Після введення аспірату кісткового мозку переважно пригнічувалась прозапальна реакція лейкоцитів і синтез церулоплазмину, тоді як дія ЗТП не супроводжувалась таким ефектом. Також перевага дії аспірату клітин кісткового мозку над ЗТП та клітинами жирової тканини була пов'язана з відновленням антиоксидантної системи.

Клітинні технології оптимізують відновлення метаболічних процесів, що відображається у біохімічних показниках периферійної крові при моделюванні II стадії остеоартрозу. Ці зміни є проявом трофічної та регенеративної дії і переважно були викликані введенням аспірату кісткового мозку, як терапевтичного засобу.

Таким чином, одержані результати морфологічних та біохімічних досліджень дозволяють стверджувати про потенційну терапевтичну дію ЗТП, аспірату кісткового мозку та жирової тканини. Цей ефект полягає у пригніченні розвитку запалення і деструктивних змін у субхондральній кістці, у капсулі суглоба та менісках. Ці дані свідчать про оптимізацію перебігу відновних процесів у колінному суглобі. Введення аспірату кісткового мозку пригнічувало пошкодження меніска колінного суглоба та синовіальної оболонки патологічно зміненого колінного суглоба, порівняно із застосуванням ЗТП та клітин жирової тканини. Це відобразилось на відновленні

досліджуваних біохімічних показників.

Ключові слова: остеоартроз, клітинні технології, запалення, антиоксидантна система, колінний суглоб, ортопедичне лікування, суглубовий хрящ, репаративний потенціал кісткового мозку, хрящ, кісткова тканина, маркери ремоделювання кісткової тканини, кістковий метаболізм, зв'язки колінного суглоба, збагачена тромбоцитами плазма, аспірат кісткового мозку, остеоартрит, аутологічна плазма.

Список публікацій здобувача

1. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Спосіб моделювання хронічного остеоартрозу колінного суглоба у кролів. Патент України на корисну модель № 130791, Опубл. 26.12.2018, бюл. № 24. Доступний через: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=253962>.

2. Ткачук ПВ, Страфун СС, Кучменко ОБ, Савосько СІ, Гайович ІВ, Макаренко ОМ, Мхітарян ЛС, Дроботько ТФ. Оцінка впливу тромбоцитарної плазми на біохімічні показники крові в експериментальній моделі остеоартрозу колінного суглоба. Травма. 2019;20(4): 39-45. *(Особистий внесок – вивчення літератури за темою, проведення експериментів на лабораторних тваринах, підготовка статті до друку)*. Доступний: <https://trauma.zaslavsky.com.ua/index.php/journal/article/view/741/773>

3. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Вивчення структурних особливостей при експериментальному хронічному остеоартрозі колінного суглоба в кролів. Травма. 2018;19(6):71-76. *(Особистий внесок – аналіз отриманих даних, статистична обробка та узагальнення результатів експериментів, підготовка статті до друку)*. Доступний через: <http://www.mif-ua.com/archive/article/46993>

4. Ткачук ПВ, Страфун СС. Морфологічна оцінка структурних змін колінного суглобу при експериментальному остеоартрозі та застосуванні

аутологічного аспірату кісткового мозку. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2019;19, вип. 4(68): 88-94. *(Особистий внесок – автор самостійно оволодів методикою отримання аутологічного аспірату кісткового мозку, проводив експериментальні дослідження на дослідних тваринах з моделлю остеоартрозу, підготував статтю до друку)*. Доступний через:

<https://visnyk-umsa.com.ua/index.php/journal/article/view/164/161>

5. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Структурні порушення колінного суглоба при моделюванні остеоартрозу. Травма. 2019;20(1): 73-78. *(Особистий внесок – автор самостійно проводив експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів)*. Доступний через:

<http://www.mif-ua.com/archive/article/47221>

6. Ткачук ПВ, Страфун СС. Дослідження впливу клітинних технологій на розвиток остеоартрозу колінного суглобу в експерименті. Травма. 2019;20(5): 20-27. *(Особистий внесок – автор самостійно виконував експериментальні дослідження, провів порівняльний аналіз використання аспіратів клітин різних тканин, підготував рукопис статті до друку)*. Доступний через:

<http://www.mif-ua.com/archive/article/48595>

7. Tkachuk P, Savosko S, Strafun S, Kuchmenko O, Makarenko O, Mkhitaryan L, Drobotko T. Correlation of blood biochemical indicators with the level of knee joint damage in the model of the posttraumatic osteoarthritis. Georgian Med News. 2020;309:135-141. *(Особистий внесок – розробка плану досліджень, статистичний аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку)*.

Доступний через:

<http://ir.librarynmu.com/bitstream/123456789/3297/1/CORRELATION%20F%20BLOOD%20BIOCHEMICAL%20INDICATORS%20WITH%20THE%20LEVEL.pdf>

8. Ткачук ПВ, Страфун СС. Морфологічні та біохімічні показники остеоартрозу колінного суглобу (на основі розробки експериментальної

моделі). 42 Наукові Читання імені О.О. Богомольця (24 травня 2021 року, Київ). С. 18-19. *(Особистий внесок – аналіз та статистична обробка отриманих даних, оформлення тез)*. Доступний через:

<http://ir.library.nmu.com/bitstream/123456789/2337/1/42%20%D0%A7%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%91%D0%BE%D0%B3%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D1%8C%D1%86%D1%8F.pdf>

9. Ткачук П.В. Дослідження ефективності впливу клітинних технологій на розвиток остеоартрозу колінного суглобу. III з'їзді ГО «Всеукраїнської асоціації травматології та остеосинтезу» (12-13 березня 2020 року, Київ). *(Особистий внесок – розробка плану досліджень, аналіз отриманих даних, статистична обробка та узагальнення результатів, підготовка тез до друку)*.

10. Ткачук П.В. Концентрований аспірат кісткового мозку в лікуванні патології кісток та суглобі. Актуальні питання артроскопічної хірургії колінного суглобу (25 вересня 2020 року, Київ). *(Особистий внесок – вивчення літератури за темою, статистична обробка та узагальнення результатів експериментальних досліджень, підготовка тез до друку)*.

11. Ткачук П.В. Клітинні та тканинні технології в лікуванні остеоартрозу (21-22 жовтня 2021 року, Київ). *(Особистий внесок – вивчення літератури за темою, статистична обробка та узагальнення результатів експериментальних досліджень, підготовка тез до друку)*.

12. Робота була представлена на засіданнях Вченої ради ДУ «Інституту травматології та ортопедії» НАМН України 2021 та 2022 років.

ABSTRACT

Tkachuk P.V. Cellular and tissue technologies in the treatment of osteoarthritis (experimental study). – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The dissertation for obtaining a scientific degree of the Doctor of Philosophy on a specialty 14.01.21 – “Traumatology and Orthopedics” (222 – Medicine). – State Institution «Institute of Traumatology and Orthopedics of NAMS of Ukraine», Kyiv, 2023.

The dissertation is devoted to a comparative study of the impact of cellular technologies on the osteoarthritis development. The relevance of the topic is beyond doubt, since damage to the knee joint and the development of osteoarthritis ranks second after damage to the hip joint and leads to long-term disability. Conservative treatment of the disease is accompanied by only temporary relief, does not prevent the progression of the pathological process and requires surgical treatment. Primary biomechanical damage is considered the main factor in the development of osteoarthritis. Acute and chronic damages to the joint structures induce the development of a local inflammatory pathological response, which leads to degenerative changes in the structural formations of the cartilage and the appearance of progressive destruction of the articular surface. The analysis of the osteoarthritis (osteoarthritis) pathogenesis made it possible to determine the main links in the development of the disease and to develop an experimental model that is most appropriate for clinical cases with traumatic deforming osteoarthritis.

The next stage of the work was to study the effect of platelet-rich plasma (PRP), bone marrow aspirate cells and adipose tissue injected into the knee joint. The selected approaches of cell therapy are promising areas in the treatment of various diseases, in particular in traumatology, therefore, the study of their effects of action is necessary to understand the mechanisms of regenerative effects and effectiveness. To implement the tasks set, an experimental study was carried out. His object was the knee joint of rabbits 1.5 and 2.5 months after osteoarthritis modeling.

Based on the analysis of literary sources devoted to the study of traumatic

damages to the knee joint, the arthrosis model was modified, and a patent for Ukraine No. 130791 was obtained. The proposed experimental model consists in combining two dependent pathogenetic factors – a traumatic defect in the ligament, concomitant and ischemic damage to the tissue. To do this, the rabbits underwent the intersection of the medial ligament, to change the physiological biomechanics of the joint. Additionally, a defect in the articular surface of the tibia was created for traumatic damage to the joint. Thermal injury of the joint capsule was caused by vascular coagulation, which was accompanied by impaired regional blood circulation. Damage to the knee joint has led to instability and its biomechanics failure. In addition, there were progressive structural changes in the components of the joint. According to morphological criteria, these changes were assessed as stage II of the disease.

Progressive damage to the articular cartilage of the tibia was established by histological methods and several key conclusions about the development of osteoarthritis were made. The first is that transection of the medial ligament causes instability and altered biomechanics of the knee joint. Additional focal mechanical damage initiates progressive deformation of the articular cartilage. At the morphological level, degenerative changes in this structure are manifested in a decrease of its thickness. Disorders are not limited to the area of a traumatic defect and progress in the primary intact areas of the articular surface. These changes are based on dystrophy of hyalin cartilage chondrocytes, death and a decrease in the cell composition of cartilage, the appearance of acellular lacunae in a chondromyxoid (chondromucoid). Based on the analysis of the nature of the development of articular cartilage damage, it was concluded that degenerative changes begin from the superficial small cell layers of the cartilage tissue. The reduction of cellular composition progresses radially from the defect zone. Structural changes after the transection of the medial ligament with the initiation of damage to the articular cartilage surface were assessed as stage II of osteoarthritis.

The second conclusion is that the modeling of impaired biomechanics of the knee joint with local damage to its cartilage affects the structural changes in other cellular formations. Thus, the development of dystrophic changes in the menisci and

joint capsule was histologically confirmed. At the microscopic level, the body of the menisci is represented by hyaline cartilage tissue, as are the articular surfaces. Therefore, the morphological manifestations of menisci damage were similar to those mentioned above. In particular, dystrophy and death of isogenic groups of chondrocytes, destructive changes in chondromucoid and damage to the meniscus vessels were revealed. Changes in the menisci are associated with disturbed biomechanics of the knee joint. The latter arose as a result of the intersection of the medial ligament, the development of inflammation in the knee joint, and a disruption of regional microhemocirculation. Changes in the menisci are associated with impaired biomechanics of the knee joint.

The third conclusion is that combined traumatic and thermal damages to the capsule of the knee joint, along with the intersection of the medial ligament, cause fibrotic changes in the outer layer of the capsule and dystrophic disorders of the synovial membrane. Microcirculation disorders are manifested by hyperemia, necrosis of blood vessels, and leukocyte infiltration. Changes in the capsule vessels were heterogeneous and depended on the angioarchitectonics of the capsule. So, in the fibrous layer, stasis reactions of small arteries and veins mainly occur, and in the villi of the synovial membrane, dystrophic changes in microvessels often occurred. At the same time, damage to the villi progressed from 1.5 to 2.5 months after damage, and the appearance of focal fibroblast proliferation in the synovial membrane was assessed as structural manifestations of progressive fibrous changes in the capsule wall from its outer layers to its inner ones. Based on the established dystrophic changes in the villi, it is possible to explain the pathogenesis of disorders in the synthesis and exchange of synovial fluid in this disease.

The fourth conclusion is that damage to the articular cartilage with the accompanying inflammatory process affects the density of the subchondral bone tissue. A decrease in the density of bone trabeculae with dystrophic changes in the deep layers of cartilage is explained by several reasons. We are talking about the appearance of empty lacunae, progressive damage to the tibial epiphysis, spreading from the defect zone, due to joint instability and changes in its biomechanics after

crossing the medial ligament. At the same time, the density of the subchondral bone depends inversely proportional on the degree of inflammation in the joint.

The results of histological studies showed the multifocal nature of structural changes and their progressive nature in the knee joint when modeling stage II osteoarthritis. It was concluded that the synovial membrane of the capsule, menisci and articular cartilage are targets that need trophic support and activation of endogenous regeneration mechanisms. In this regard, these structural formations were studied in detail after the administration of some cell suspensions into the joint.

The use of PRP contributed to the preservation of the villi of the synovial membrane and the lining of the joint capsule. At the same time, foci of hemorrhagic penetration in the subsynovial layer indicated a microcirculation disorder, which requires additional therapeutic intervention. The analysis of the histological structure of the menisci showed the protective effect of platelet plasma on the cartilage matrix of the meniscus body. At the same time, dystrophic changes of chondrocytes were also detected. This indicates limited trophic support of this therapeutic agent. At the same time, the thickness of the perifocal zone of the epiphyseal cartilage increased statistically significantly, by an average of 18.2 % compared to the group with osteoarthrosis ($p < 0.05$). Accumulations of platelets in the capsule lumen 1.5 months after administration were not found, which indicates their total destruction and non-toxicity of such a therapeutic agent for the treatment of osteoarthritis.

Some important signs of the recovery process were established after the aspirate of bone marrow cells was injected into the knee joint. The main conclusion is that 1.5 months after the administration of cellular aspirate of reticular tissue with cells of the hematopoietic series (blast forms) are preserved. The morphogenesis of these cells is accompanied by additional angiogenesis, as well as their integration with the synovial membrane and connective tissue of the menisci. This contributed to the preservation of the menisci and synovial membrane, in particular, the density and length of their villi. However, unfortunately, no pronounced inhibition of dystrophic changes in the cartilaginous tissue of the articular surface of the tibia was found. This is explained by severe damage and the development of degenerative changes in the

cartilage tissue and its weak potential for reparative regeneration. The injection of adipose tissue aspirate into the knee joint was characterized by the formation of adipocyte cells in the capsule cavity and their integration with the synovial membrane. At the same time, the appearance of individual cells in the subsynovial zone was observed. But the newly formed foci of adipose tissue did not contribute to the significant preservation of the articular cartilage. Morphometric evaluation did not show a statistically significant difference between the cartilage thickness parameters compared to the group with osteoarthritis (although a tendency to increase the density of the isogenic groups was noted). The morphogenesis of loose connective tissue around the meniscus was assessed as a manifestation of reparative regeneration.

In comparative terms, the use of bone marrow and adipose tissue cells, predominantly, but not PRP, affected the processes of regeneration of the synovial membrane and joint menisci. Inhibition of the development of destructive changes and resorption of bone trabeculae in the epiphyseal region occurred with the use of PRP and bone marrow aspirate. The relative density of bone tissue increased by 11.7 % and 15.6 % ($p < 0.05$) compared with the experimental index. And with the administration (injection) of adipose tissue aspirate, only a tendency to similar positive effect can be observed. It was concluded that the degree of damage to the epiphyseal bone depends on the extent of development of the inflammatory process in the joint and the presence of inflammatory infiltration in the subchondral zone. We are talking about the process that occurs in the lacunae of the cancellous bone, where the bone marrow is localized. The lack of action of adipose tissue cells on subchondral bone tissue is associated with the appearance of inflammatory infiltration and is a negative consequence of such effect.

In order to study the consequences of the development of ischemic and inflammatory tissue damage in modeling the stage II of osteoarthritis, a biochemical study was carried out. In the work, indicators were selected that are directly related to the inflammatory process: the activity of leukocyte elastase, myeloperoxidase, paraoxonase-1, as well as ceruloplasmin, products of oxidative modification of

proteins and lipids (diene conjugates, TBA-active products), enzymes of antioxidant protection (catalase and superoxide dismutase (SOD)). The results of biochemical studies showed changes leading to the accumulation of cytotoxic products of oxidative modification during the pathological process. After the administration of bone marrow aspirate, the pro-inflammatory reaction of leukocytes and the synthesis of ceruloplasmin were predominantly suppressed, when the action of PRP was not accompanied by such effect. Also, the advantage of bone marrow cell aspirate over PRP and adipose tissue cells was associated with the restoration of the antioxidant system.

Cellular technologies optimize the recovery of metabolic processes, which is reflected in the biochemical parameters of peripheral blood when modeling stage II osteoarthritis. These changes are a manifestation of trophic and regenerative action and were mainly caused by the administration of bone marrow aspirate as a therapeutic agent.

Thus, the obtained results of morphological and biochemical studies allow us to assert the potential therapeutic effect of PRP, bone marrow and adipose tissue aspirate. This effect consists in inhibiting the development of inflammation and destructive changes in the subchondral bone, in the joint capsule and menisci. These data indicate the optimization of the course of recovery processes in the knee joint. The administration of bone marrow aspirate inhibited damage to the meniscus of the knee joint and synovial membrane, pathologically altered knee joint compared with the use of PRP and adipose tissue cells. This was reflected in the restoration of the studied biochemical parameters.

Key words: osteoarthritis, cell technologies, inflammation, antioxidant system, knee joint, orthopedic treatment, articular cartilage, bone marrow reparative potential, cartilage, bone tissue, markers of bone remodeling, bone metabolism, knee ligaments, platelet-rich plasma, bone marrow aspirate, osteoarthritis, autologous plasma.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ ТА ПРОБЛЕМАТИКУ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСТЕОАРТРОЗУ КОЛІННОГО СУГЛОБА	29
1.1. Аналіз патогенетичних аспектів розвитку і прогресування травматичного остеоартрозу колінних суглобів	29
1.2. Особливості моделювання хронічного остеоартрозу великих суглобів у лабораторних тварин	36
1.3. Аналіз та порівняння ефективності існуючих засобів терапії експериментального остеоартрозу колінних суглобів	49
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	56
2.1. Експериментальна модель остеоартрозу	56
2.2. Способи отримання клітинних лікувальних засобів	57
2.3. Протокол гістологічного дослідження	58
2.4. Протокол біохімічного дослідження	61
2.5. Статистичні дослідження	62
2.6. Біоетичні аспекти виконання роботи	62
РОЗДІЛ 3 ПОРУШЕННЯ СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ КОЛІННОГО СУГЛОБА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ОСТЕОАРТРОЗУ	63
3.1. Результати дослідження капсули колінного суглоба	63
3.2. Результати дослідження суглобових менісків	74
3.3. Результати дослідження структурних змін суглобової поверхні колінного суглоба	77
Заключення до розділу 3	83
РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАРНОЇ ПЛАЗМИ, КЛІТИН АСПРАТИВ	

КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ НА РОЗВИТОК СТРУКТУРНИХ ЗМІН КОЛІННОГО СУГЛОБА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ОСТЕОАРТРОЗУ	86
4.1. Результати досліджень структурних змін капсули колінного суглоба після введення клітинних суспензій	86
4.2. Дослідження структурних змін менісків колінного суглоба	97
4.3. Структурні зміни суглобової поверхні великогомілкової кістки колінного суглоба	105
4.4. Дослідження субхондральної кісткової тканини великогомілкової кістки колінного суглоба	114
Заклучення до розділу 4	119
РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗІ КОЛІННОГО СУГЛОБА	122
5.1. Результати дослідження продуктів пероксидації та ферментативної активності лейкоцитів крові	122
5.2. Відновлення показників крові при остеоартрозі та застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми	125
5.3. Біохімічні зміни показників крові при остеоартрозі та після введення аспіратів кісткового мозку та жирової тканини	127
5.4. Результати кореляційного аналізу зв'язку біохімічних показників та ступеня пошкодження колінного суглоба	128
Заклучення до розділу 5	141
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	144
ВИСНОВКИ	155
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	159
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВК – великогомілкова кістка

ЗТП – збагачена тромбоцитами плазма

ІІ – інтерлейкін

МЗ – медіальна зв'язка

МЙА – монокристалічний йодацетат

ММП – матриксні металопротеїнази

НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби

ПВОб – продукти вільнорадикального окислення білків

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

ЧНП- α – чинник некрозу пухлин

ЧРЕС – чинник росту ендотелію судин

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Osteoартроз – хронічне захворювання суглобів, яке полягає у прогресуючих дистрофічних змінах хрящових поверхонь суглобів та субхондральної кістки. Захворювання має різну етіологію, активно досліджується і дискутується у клінічних та експериментальних працях. Для його лікування розроблено різні консервативні та хірургічні методи лікування, проте їх ефективність залишається незадовільною.

Останнім часом стало загальновизнаним, що основною причиною розвитку остеоартрозу є не лише механічна травма, але і процес хронічного запалення, яке стимулює прогресування цього складного захворювання [1]. В той же час з'ясовано, що у здорових молодих людей остеоартроз може розвиватись навіть через десятиліття після отримання гострих травм, в тому числі і спортивних. Стало зрозумілим, що значну роль у патогенезі прогресування даного захворювання відіграють і механізми фізичного впливу. Крім того було показано, що прогресування ожиріння, враховуючи динаміку патобіохімічних процесів, і, особливо, експресію запальних та метаболічних патогенетичних регулятивних чинників, негативно впливає на розвиток остеоартрозу, загострюючи механопатологічні зміни у різних елементах суглобів. Так, за прогнозами Центру по контролю та профілактиці захворювань (США), з 2030 року 86 % населення з надмірною вагою старше 65 років будуть страждати від прогресуючого остеоартрозу та інших захворювань опорно-рухового апарату [2].

У пацієнтів з хронічним остеоартрозом тривалий перебіг процесу низько-інтенсивного запалення стає основним рушієм поступово наростаючого руйнування структурних елементів суглобів. Це додатково підтверджує зв'язок появи декількох захворювань, пов'язаних зі старінням та хронічним запаленням тканин великих суглобів [3].

Розвиток різної інтенсивності хронічного запалення тканин суглобів при остеоартрозі, після нанесення первинної механічної травми, впливу фізичного

перенавантаження характеризується як «самоузгоджений цикл локального пошкодження, цикл запалення та відновлення тканини». Іншими словами, при остеоартрозі суглоби знаходяться в стані «хронічної рани» [4]. Початкове пошкодження тканин, внаслідок впливу на суглоби гострої, підгострої або хронічної травми, індукує розвиток місцевої патологічної запальної реакції, що пізніше призводить до втрати компонентів хряща та появи, прогресуючого у часі, травматичного пошкодження структурних елементів великих суглобів. Тому первинні біомеханічні ушкодження вважаються основними чинниками розвитку остеоартрозу. Встановлення цього чиннику дозволило розробити ряд експериментальних моделей травматичного деформуючого остеоартрозу, які включають перетин зв'язок суглоба, а також механічне пошкодження суглобової поверхні та меніска. Це дозволило вивчати патогенез захворювання та оцінювати ефективність нових способів лікування.

Універсальним способом моделювання остеоартрозу у лабораторних тварин є перетин передньої хрестоподібної зв'язки, що призводить до пошкодження хрящів, зміни поверхні суглобових хрящів та значні утворення остеофітів субхондральної кістки та подальшої її резорбції [5]. Структурні зміни розвиваються у різній мірі у терміни від 4 до 10 тижнів, тоді як, для достовірної оцінки ефективності досліджуваних терапевтичних засобів, періодизація і ступінь розвитку змін мають бути стандартизованими. При цій патології можлива компенсаторна активація ангиогенезу та ішемічні зміни тканин хряща, а також кістки [6, 7]. Судинна інвазія у пошкоджений хрящ провокує прогресування остеоартрозу. При цьому, судинний чинник відіграє не останню роль у патогенезі остеоартрозу. Порушення кровопливу у судинах кістки і синовіальної оболонки призводить до некрозу судин та навколишнього хряща. Є два пояснення, які індивідуально можуть дати відповідь на те, чому виникає ішемія у суглобі при запаленні, а саме: підвищений метаболізм у тканинах, з утворенням прозапальних молекул та недостатня доставка кисню через погану перфузію у судинах запаленого суглоба. Насправді, обидва чинники характерні для запального процесу у суглобі [8]. Ці результати

дозволили припустити, що життєздатність епіфізарного хряща суглоба залежить від адекватного кровопостачання оточуючих судин, та сильно впливає на стан кровопостачання в патогенезі остеохондрозу, остеоартрозу [9]. Показано спонтанні ураження та некроз епіфізарного хряща стегнової кістки, які були пов'язані з порушенням кровообігу в судинах суглобів [10]. Структурно-функціональні порушення ендотелію збільшують тромбоз та підвищують його ризик, призводять до ішемічного ураження м'яких тканин, капсули суглоба та некрозу кісткової тканини. Ендотеліальна дисфункція у пацієнтів з деформуючим остеоартрозом супроводжується порушенням тонусу вен нижніх кінцівок, що проявляється збільшенням діаметру вен, їх дилатації, і сприяє розвитку тромботичних ускладнень після ендопротезування великих суглобів [11]. Разом з тим, судинний чинник є самостійним чинником мінералізації суглобового хряща. Аналіз літературних джерел не показав достовірних статистичних даних щодо частоти та рівня ішемізації, перфузії у колінному суглобі при остеоартрозі різного генезу, хоча при септичному артриті ці зміни констатуються як один з основних супутніх патологічних станів. Очевидно, що цим змінам не приділяється достатньої уваги і саме тому, дослідження ролі судинних порушень у колінному суглобі за норми та патології є окремим завданням у вирішенні проблеми лікування остеоартрозу. Враховуючи цей факт, у власному дослідженні судинний чинник розглядався як одна із патогенетичних ланок розвитку пошкодження тканин колінного суглоба. Пошкодження кровоносних судин капсули суглоба було використано в якості додаткового чинника розвитку остеоартрозу при розробці експериментальної моделі захворювання. Раніше даний аспект розвитку патології розглядався лише побічно та фрагментарно.

На сьогодні основним напрямком консервативного лікування остеоартрозу колінного суглоба є зниження больових відчуттів, реалізація протизапальної дії, збільшення або збереження, існуючого на момент діагностування захворювання, діапазону рухів, мобільності кінцівок в суглобах, а також поліпшення якості життя. Останнє пов'язано, в першу чергу, із

організацією охорони здоров'я у кожній окремо взятій країні [12]. При цьому, основні науково обґрунтовані стратегії терапії остеоартрозу у хворих можна класифікувати за типом функціональності, конкретними засобами лікувальної дії, тощо. До цих засобів і технологій із наявністю доведених під час GCP досліджень лікувальних ефектів, в першу чергу, слід віднести анальгетики і нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ), сучасні біологічні (античинникові) засоби, трансплантацію стовбурових клітин і окремо виконані хірургічні процедури.

Розробка оптимальних способів корекції дегенеративно-дистрофічних захворювань колінного суглоба наразі є актуальною проблемою сучасної травматології [13]. Перспективним напрямком регенеративної медицини є застосування аутологічних клітинних технологій. На сьогодні, почали застосовувати кілька таких напрямків: введення ЗТП, аспірату клітин червоного клітинного мозку, клітин похідних жирової тканини [14]. ЗТП одержують як продукт плазморефузії крові, концентрація тромбоцитів в якій, кратно перевищує вихідні значення у крові (6×10^3 - 7×10^8 1/мл) [15, 16]. Стратегію її застосування пояснюють трофічною дією чинників росту (чинник росту тромбоцитів, чинник росту ендотелію судин (ФРЕС)), чинник росту фібробластів, що виділяються тромбоцитами після введення у тканини та мають регенеративні властивості [17]. У деяких статтях показано, що вивільнення чинників росту тромбоцитами відбувається протягом 1 години [18], а кількість пошкоджених тромбоцитів при одержанні концентрату не перевищує 20 % [19]. Локальні високі концентрації чинників росту можуть бути корисні для підтримки нормального функціонування тканин суглобу, але незважаючи на це, існує полеміка щодо цитотрофічної дії та безпечності застосування ЗТП у лікуванні травматичних та дегенеративних захворювань суглобів [20, 21].

Іншим напрямком є застосування аутологічних клітинних похідних кісткового мозку та жирової тканини. Одержання аспірату кісткового мозку стало загально визнаним способом у лікуванні остеоартрозу [22].

Передбачається, що мезенхімальні клітини кісткового мозку та жирової тканини здатні диференціюватися у хондроцити, адипоцити, фібробласти, а також паракринно впливати на ангиогенез і регенерацію тканин [23]. Триває дискусія щодо відмінностей між часткою одержаних клітин із аутологічних тканин, кінетикою росту та здатністю їх до диференціації в ушкоджених тканинах. При вивченні на експериментальних моделях і в клініці, були встановлені позитивні результати використання цих клітинних технологій при лікуванні остеоартрозу. Ми передбачаємо, що аспірат жирової тканини може бути альтернативою застосування клітин червоного кісткового мозку та ЗТП. У цьому дослідженні ми висунули гіпотезу, що введення у колінний суглоб ЗТП, аспірату клітин кісткового мозку та клітин похідних жирової тканини сприяє підтримці суглобового хряща при остеоартрозі, активує відновні процеси у пошкоджених тканинах, тим самим, зменшуючи інтенсивність запалення і пошкодження суглоба, що сприяє активації перебігу відновних процесів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»: “Розробити та експериментально дослідити регенеративні технології при остеоартрозі та асептичному некрозі кульшового та колінного суглобів” 2022-2024 рр. (№ держреєстрації 0122U000200).

Мета дослідження: дослідити вплив ЗТП, клітин аспірату кісткового мозку та жирової тканини на розвиток структурних порушень колінного суглоба на моделі деформуючого артрозу в експерименті.

Завдання дослідження:

1. Розробити експериментальну модель остеоартрозу колінного суглоба, що крім механічної травми суглобового хряща, включає перетин медіальної зв'язки і супутню ішемізацію капсули суглоба.
2. Дослідити структурні зміни капсули колінного суглоба після моделювання остеоартрозу у термін 1,5 і 2,5 місяці.
3. Дослідити структурні зміни менісків колінного суглоба на тлі розвитку

остеоартрозу.

4. Визначити особливості пошкодження суглобового хряща після моделювання остеоартрозу у термін 1,5 і 2,5 місяці.

5. Дослідити вплив ЗТП, аспіратів кісткового мозку та жирової тканини на розвиток структурних змін капсули та менісків колінного суглоба у тварин з остеоартрозом (термін спостереження – 2,5 місяці).

6. Дослідити дію ЗТП, аспірату кісткового мозку та жирової тканини на пошкодження суглобового хряща через 2,5 місяці з часу моделювання остеоартрозу.

7. Дослідити зміни біохімічних показників крові після моделювання остеоартрозу колінного суглобу, які пов'язані з запальними та метаболічними змінами: активністю лейкоцитарної еластази, мієлопероксидази, параоксонази-1, каталази, СОД плазми крові та рівнем церулоплазміну, глутатіону, продуктів пероксидації (дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів) (термін спостереження – 1,5 місяці).

8. Оцінити зміни біохімічних показників крові при застосуванні ЗТП, аспіратів кісткового мозку та жирової тканини у тварин з остеоартрозом колінного суглоба (термін спостереження – 2,5 місяці).

Об'єкт дослідження: колінний суглоб на тлі деформуючого остеоартрозу та при застосуванні клітинних технологій.

Предмет дослідження: структурні зміни капсули, меніска, суглобового хряща та субхондральної кісткової тканини колінного суглоба на тлі остеоартрозу та після введення у колінний суглоб кроликів ЗТП, аспіратів кісткового мозку та жирової тканини.

Методи дослідження:

1. Експериментальний – розробка моделі остеоартрозу.

2. Гістологічний – дослідження структурних порушень у тканинах капсули суглоба, менісках і суглобових поверхнях при експериментальному остеоартрозі та його корекції при використанні клітинних технологій.

3. Морфометричний – кількісна оцінка змін товщини суглобового хряща і

відносної щільності субхондральної кісткової тканини.

4. Біохімічний – дослідження змін прооксидантно-антиоксидантного балансу, рівня церулоплазміну та активності лейкоцитарних ферментів.

5. Статистичний – оцінка достовірності одержаних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Створена нова експериментальна модель остеоартрозу, на основі перетину медіальної зв'язки, локального механічного дефекту суглобового хряща і термокоагуляції кровоносних судин капсули суглобу. Комплексний вплив цих чинників веде до нестабільності суглобу, змін біомеханіки, розвитку запальної реакції з ішемізацією параартикулярних тканин, що призводить до прогресуючого розвитку дегенеративних змін.

Вперше проаналізовано дію аспіратів кісткового мозку і жирової тканини в інтеграції введених клітин з синовіальною оболонкою та сполучною тканиною менісків, що вказує на життєздатність клітин аспіратів упродовж одного місяця, на тлі розвитку патологічного процесу, та їх, ймовірно, паракринну участь у процесах ремоделювання та регенерації пошкоджених тканин. У порівняльному аспекті тканинні реакції були більш вираженими після введення аспірату кісткового мозку, ніж жирової тканини. Вони полягали у морфогенезі ретикулярної тканини і додатково ангиогенезу. Збагачена тромбоцитами плазма у синовіальній оболонці та менісках не викликала додаткового розвитку тканин. Вперше досліджені біохімічні показники крові, при запропонованій моделі остеоартрозу: церулоплазмін, лейкоцитарна еластаза, мієлопероксидаза, ТБК-реагуючі продукти, каталаза і глутатіон, та їх зміна при внутрішньосуглобовому введенні плазми, збагаченої тромбоцитами, аспіратів кісткового мозку та жирової тканини. Ці дані свідчать про розвиток запалення, зниження активності антиоксидантної системи при рості продуктів окисної модифікації ліпідів та білків.

Отримали подальший розвиток знання про те, що клітинні аспірати оптимізують відновлення метаболічних процесів у тканинах суглобу. Це, з високою достовірністю і рівнем кореляції, відображається у біохімічних

показниках периферійної крові тварин, що є проявом трофічної та регенеративної дії досліджуваних тканинних технологій, але у більшій мірі ці дії проявляються при введенні аспірату кісткового мозку.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати дослідження розширюють уявлення сучасної концепції патогенезу остеоартрозу. Показники біохімічного профілю периферійної крові, які вивчались при моделюванні остеоартрозу в експерименті, можуть бути використані для оцінки перебігу захворювання та динаміки реабілітації. Створено наукові передумови для застосування клітинних технологій у хворих, з метою терапії остеоартрозу. Доведено біологічну безпечність застосування аутологічних клітинних суспензій кісткового мозку та жирової тканини при введенні у колінний суглоб. Результати дисертаційного дослідження можуть слугувати підґрунтям для удосконалення та розробки нових підходів у лікуванні пацієнтів із хронічними запальними і дегенеративними захворюваннями колінного суглоба.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно визначив мету та завдання дослідження, провів аналітичний огляд наукової літератури. Самостійно розробив план експериментального дослідження, здійснював моделювання остеоартрозу та проведення усіх хірургічних маніпуляцій з тваринами. Самостійно здійснював забір біологічного матеріалу (крові) для біохімічних досліджень. Здобувачем самостійно написано розділи дисертаційної роботи, разом з науковим керівником сформульовано основні висновки дисертації та практичні рекомендації. Автор самостійно підготував рукописи наукових публікацій та тези доповідей на науково-практичні конференції.

Автор висловлює глибоку вдячність науковому керівнику за допомогу у постановці задач і організації дослідження. Висловлює вдячність к.мед.н. І.В. Гайовичу (ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», відділення мікрохірургії та реконструктивно-відновної хірургії верхньої кінцівки) за допомогу у підготовці концентрату ЗТП і клітинних

аспіратів; д.б.н., проф. О.Б. Кучменко (ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М.Д. Стражеска НАМН України») за допомогу у проведенні біохімічних досліджень; к.б.н., доц. С.І. Савоську (Національний медичний університет імені О.О. Богомольця) за допомогу у проведенні експериментальних і морфологічних досліджень.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднені на III з'їзді Всеукраїнської асоціації травматології та остеосинтезу (12-13 березня 2020 року, Київ, Україна), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «42 Наукові читання імені О.О. Богомольця, присвячені 140-річчю з дня народження академіка О.О. Богомольця» (24 травня 2021 року, Київ, Україна).

За матеріалами дисертації опубліковано 6 наукових статей, з них 1 індексується у наукометричній базі Scopus та 5 у фахових наукових журналах, 3 тези у матеріалах наукових конгресів і конференцій, одержано 1 Патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 177 сторінках друкованого тексту. Рукопис складається з анотації двома мовами (українською та англійською), вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 3-х розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який налічує 188 посилань (з них – 14 кирилицею, а 174 – латиницею). Текст дисертації проілюстровано 32 рисунками та 16 таблицями.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПАТОГЕНЕЗ ТА ПРОБЛЕМАТИКУ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСТЕОАРТРОЗУ КОЛІННОГО СУГЛОБА

1.1. Аналіз патогенетичних аспектів розвитку і прогресування травматичного остеоартрозу колінних суглобів

Серед загальних захворювань суглобів людини остеоартроз залишається основною нозологією, а його частоту в популяції можна порівняти з відповідними сезонними застудними і вірусними захворюваннями [24, 25]. Економічний збиток від зазначеної хвороби для системи охорони здоров'я США складає мільйони доларів, а витрати на одного пацієнта, який страждає на остеоартроз, в 2004 р. склали понад \$5700 [2].

У сучасній фаховій літературі остеоартроз розглядається як гетерогенна група захворювань різної етіології з подібними патогенетичними, морфологічними і клінічними проявами. Історично складалось так, що остеоартроз вивчався переважно як захворювання, що розвивається внаслідок впливу біомеханічного стресу, отриманого внаслідок зростаючого навантаження на суглоби, прогресуючого ожиріння та травматичного ушкодження зв'язкового апарату [25, 26, 27].

Останнім часом стало відомим і загальновизнаним, що основною причиною розвитку остеоартрозу є хронічне запалення, яке не лише викликає, але і стимулює прогресування цього складного захворювання. В той же час, у процесі проведення численних наукових досліджень було з'ясовано, що у здорових молодих людей остеоартроз може розвиватись навіть через десятиліття після отримання гострих механічних та спортивних травм. Стало зрозумілим, що значну роль в патогенезі прогресування даного захворювання відіграють і механізми фізичного впливу. Крім того, було встановлено, що прогресування ожиріння, враховуючи динаміку патобіохімічних процесів, і, особливо, експресію запальних та метаболічних патогенетичних регулятивних чинників,

дозволило вважати, що вплив ожиріння на розвиток остеоартрозу більш складний, ніж виключно прогресуюча механопатологічна або травмуюча дія на різні елементи суглобів. Важливим чинником розвитку остеоартрозу вважається ожиріння, що швидко прогресує у осіб середнього і, особливо, похилого віку. Так, за прогнозами Центру по контролю та профілактиці захворювань (США), населення цієї країни страждає від надмірної ваги і до 2030 року 20 % її мешканців не лише досягнуть 65 років, але серед них 86 % будуть мати ожиріння та потерпати від прогресуючого остеоартрозу й інших захворювань опорно-рухового апарату [2].

Фахівці характеризують остеоартроз як динамічну хворобу, яка, в першу чергу, ушкоджує гіаліновий хрящ суглобових поверхонь. Його руйнування є невід'ємною складовою розвитку цієї хвороби [28].

На сучасному етапі, хрящова тканина розглядається, як складний комплекс, в якому знаходиться значний об'єм позаклітинного матриксу з колагеновими фібрилами типу II і XI (що знайдені в середині цілісних фібрил) та типу IX (локалізовані в поверхневому шарі фібрил), агрекана (хрящового специфічного протеогліканового білка) та в меншій мірі, –агрегованого протеоглікана, молекули якого, концентруються навколо поодинокі розташованих клітин – хондроцитів. Агрекан представляє собою протеїнову макромолекулу, що складається з невеликих за молекулярною масою глікозаміногліканових ланцюгів зі значним негативним зарядом. Останні електростатично відштовхуються від ланцюгів молекул колагену типу II [29]. Електростатичне відштовхування агрекану молекулами колагену надає хрящу властивість компресійної жорсткості [30]. Хондроцити синтезують не лише зазначені білкові компоненти матриці, але і ферменти для її руйнування [31, 32, 33]. Комплекс деяких цитокінів, чинників росту, що синтезуються і виділяються синовіальними клітинами та хондроцитами, здійснюють контроль процесів матричного синтезу та руйнування зазначених речовин матриксу.

Належне функціонування хондроцитів є важливим для підтримки матриксу хрящової тканини. Суглобові хрящі та субхондральні кістки

взаємодіють між собою для забезпечення виконання суглобових функцій [34]. Деякі транскрипційні чинники виконують свої функції в обох тканинах: наприклад, транскрипційний чинник *Cbfa1* приймає участь у диференціюванні остеобластів, і дозріванні хондроцитів, в той час як *Cbfb* є важливим для стабілізації білка *Runx2* в остеобластах і диференціювання хондроцитів шляхом стабілізації білків *Runx2* та *Runx3* у хрящі [35, 36]. Таким чином, дослідники вивчають систему суглобового хряща і субхондральних кісток, як можливу терапевтичну мішень для відновлення суглобу, ураженого при остеоартрозі [37, 38, 39, 40]. Ці зміни особливо відчутні в умовах порушеної біомеханіки та гемодинаміки суглобів.

На ранніх етапах розвитку остеоартрозу, в цілому, спостерігається навіть часткове збільшення активності синтезу та секреції агрекану та посилене (активоване) формування матриксу. В той же час, синтез і вміст протеогліканового протеїну агрекану в хрящі знижується, оскільки процеси ферментативного руйнування переважають над процесами синтезу його молекул. Негативні зміни, що поступово нарастають у матриксі, призводять до збільшення вмісту води в тканині хряща, що призводить до швидкого розвитку набряку. Останнє вважається характерною особливістю раннього етапу цього захворювання [28]. Погіршення біомеханічних властивостей хряща, що спостерігається в цей час, поєднується з одночасним зменшенням вмісту молекул білків агрекану і колагену, а повторні механічні пошкодження хрящової тканини призводять до подальшої деструкції хряща (так званого процесу «зношування суглобових поверхонь»), виникнення ерозій, що поширюються на всю глибину хряща навіть до рівня субхондральної кістки великих суглобів [28].

В умовах остеоартриту, в процесі порушення обміну речовин, збільшується експресія антианаболічних, прокатаболічних та прозапальних чинників [41]. Реакції організму, які активізуються з метою компенсації цієї негативної ситуації, забезпечуються анаболічними процесами, такими як: проліферація клітин, активація біосинтезу білків, виявлення антигенів та

фагоцитоз, подібно до процесів, що відбуваються в імунній системі організму [42]. За умов перебігу остеоартрозу, ці процеси протікають у різноманітних типах клітин, зокрема, хондроцити та інші клітини великих суглобів. Це підтверджується експериментальними даними, які показали, що в хондроцитах пацієнтів з остеоартрозом, процес запалення активізується внаслідок чинників, що утворюються при метаболічному переході від окисного фосфорилування до гліколізу [43].

Хондроцитам здорових суглобових хрящів притаманна метаболічна гнучкість, що дозволяє генерувати енергію та сприяти підтримці життєдіяльності клітин у періоди гострих стресових ситуацій, шляхом підвищення регуляції мітохондріального дихання і зменшення швидкості утворення реактивних форм азоту та кисню [44]. Метаболічна дезадаптація суглобового хряща, при остеоартрозі, до нових умов, очевидна вже на самих ранніх стадіях захворювання, при спробі відновити і регенерувати ушкоджений хрящовий матрикс [27]. Проте, на більш пізніх етапах захворювання, хондроцити вже втрачають цю метаболічну гнучкість [45].

Впродовж наступних етапів розвитку остеоартрозу, зміни в молекулярному складі та структурній організації матриксу хряща призводять до прогресивного погіршення функціональних властивостей і морфологічної організації суглобових поверхонь, суттєвих змін біохімічного складу гіалінового хряща. Хондроцити зрілого суглобового хряща великих суглобів здатні реагувати на екстремальні механічні навантаження кількісними та якісними патобіохімічними порушеннями, що розвиваються в оточуючому матриксі хряща. Вони швидко реагують на вплив внутрішніх та зовнішніх чинників росту, цитокінів або дію інших запальних медіаторів [32, 46]. При тривалому прогресуванні остеоартрозу та несприятливому перебігу цього захворювання, спостерігаються певні послідовно виникаючі зміни. До них, наприклад, відноситься кластеризація хондроцитів. Ця реакція виникає внаслідок активації клітинної проліферації та індукуючого впливу на регуляцію синтетичних процесів у зазначених клітинах, що пов'язано із підвищеною продукцією

специфічних матриксних позаклітинних білків. Під час перебігу пізніх етапів розвитку захворювання спостерігається посилення і домінування катаболічної активності в матриксі хряща. При цьому, слідом за активацією генів, що відповідальні за синтез протеїназ, спостерігається поступове та суттєве зменшення рівня протеогліканів і деградація колагену типу II [32]. Результати проведених досліджень багатьма дослідниками показали, що в ході прогресування остеоартрозу встановлено збільшення кількості білків і пептидів, що також може свідчити про катаболічний характер та спрямування розвитку даного патологічного процесу. В першу чергу, це стосується ферментів матриксних металопротеїназ (matrix metalloproteinases, ММП) – ММП-1, ММП-3, ММП-9, ММП-13 ММП-14 (MT1-ММП), а також активації агрекіназ (дезінтегрину та металопротеїнази з тромбоспондіноподібними властивостями) – ADAMTS4, ADAMTS5 та ADAMTS9 [47].

Значні деструктивні зміни, що зазнає хрящова тканина при остеоартрозі, супроводжуються також підвищеною експресією генів і секрецією регуляторних білків (інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), чинника некрозу пухлин- α (ЧНП- α), рецептора кінцевих продуктів посиленого глікування (receptor for advanced glycation endproducts, RAGE), білка Ihh (Indian hedgehog), дискоїдиндоменоного рецептора 2 та частини білків із суперсімейства S100, наприклад, S100A4, S100A8, S100A9 і S100A11), матричних білків (колагенів типу II і X, агрекану, остеопонтину, тенасцину), маркерів стресу й апоптозу (каспаз 3 і 9, білку Bcl-2, нітротирозину) та чинників транскрипції (Sox9, Runx2 та ELF3) [47, 48].

На сучасному етапі вивчення актуальних питань цієї глобальної проблеми, автори розглядають остеоартроз, як хронічне запальне захворювання. Результати проведених піонерських досліджень патогенезу остеоартрозу засвідчили першочергове різке підвищення рівня запальних білків [49, 50, 51]. Використовуючи сучасні методи досліджень, одна з груп вчених вивчила та проаналізувала суттєве підвищення рівня медіаторів в синовіальній рідині при

остеоартрози, що забезпечує більш поглиблене розуміння патогенезу даного захворювання [52].

Результати досліджень інших авторів свідчать на користь розвитку системного характеру запалення різних тканин, асоційованих із прогресуванням остеоартрозу. Так, деякі результати досліджень показали, що у пацієнтів із зазначеною нозологією існує висока кореляція між рівнем С-реактивного білка в сироватці крові та відповідною активністю прогресування остеоартрозу колінних суглобів [53]. Існує позитивна кореляція між рівнем С-реактивного білка в крові та гістологічно підтвердженим розвитком синовііту, а також підвищеним вмістом ІЛ-6 у синовіальній рідині. Ці дослідження проводились під час хірургічної заміни суглобів. Наведені дані вказують на системний характер прогресуючого розвитку та перебігу запальних процесів при остеоартрози, що частково підтверджується наявністю супутнього запалення різних тканин великих суглобів пацієнтів [54]. Було проведено дослідження 70 зразків синовіальної рідини, отриманих у пацієнтів із вираженим і рентгенографічно підтвердженим остеоартрозом. Це дозволило встановити прояви запалення у 31 % обстежених. Синовіїт спостерігався навіть у пацієнтів із мінімальним ступенем прояву захворювання, згідно результатів попередньо проведеного обстеження рентгенологічного дослідження [55].

Багато авторів спостерігали прояви вираженого запалення на ранніх етапах розвитку остеоартрозу, порівняно з більш пізніми етапами цього запального та дегенеративно-деструктивного захворювання. Про це свідчить збільшення рівня інфільтрації різних тканин великих суглобів мононуклеарними лімфоїдними клітинами та встановлення значної системної експресії клітинних медіаторів запалення [56]. Ці дані досліджень підтверджують існування ініціюючого синовіального запалення на початку розвитку остеоартрозу, характеризують даний період, як надзвичайно сприятливий для проведення терапевтичних заходів, спрямованих на гальмування запального процесу. Такий підхід здатний суттєво підвищити

клінічну ефективність не лише профілактичних заходів, але лікування остеоартрозу [3].

При остеоартрозі не тільки синовіальний шар суглобів є основним місцем вираженого та цитологічно підтвердженого запалення, але він стає першою тканиною, залученою до остеоартроз-пов'язаного запалення [57]. Синовіум складається з двох-трьох клітинних шарів, в деяких з них повністю відсутні прояви запалення. Проте, при подальшому розвитку захворювання та прогресуванні запальних процесів, часто спостерігається розвиток гіперплазії синовіальних клітин, що асоціюється також, головним чином, із збільшенням кількості макрофагів, а також, Т і В лімфоїдних клітин [58], тучних клітин та лімфоїдних натуральних клітин-кіллерів [59].

Клінічні прояви та ступінь розвитку патологічного процесу при остеоартрозі відрізняється значною гетерогенністю. У деяких пацієнтів спостерігається виражена картина, що супроводжує перебіг остеоартрозу, в той же час, як і в інших випадках, виявляються мінімальні прояви запального процесу, в першу чергу, в плані виявлення дегенеративної гістопатологічної картини [56]. Саме тому у пацієнтів із хронічним остеоартрозом тривалий перебіг процесу низько-інтенсивного запалення стає основним рушієм поступового наростаючого руйнування структурних елементів суглобів. Це додатково підтверджує зв'язок появи декількох захворювань, пов'язаних зі старінням і з хронічним запаленням тканин великих суглобів [3].

Розвиток різного за інтенсивністю хронічного запалення тканин суглобів при остеоартрозі, після нанесення механічної травми, впливу фізичного перевантаження, характеризується як «самоузгоджений цикл локального пошкодження, цикл запалення та відновлення тканини. Іншими словами, при остеоартрозі суглоби знаходяться у стані хронічної рани» [4]. Початкове пошкодження, внаслідок впливу на суглоби гострої, підгострої або хронічної травми, індукує розвиток місцевої патологічної запальної реакції, що пізніше призводить до втрати компонентів хряща та появи прогресуючого в часі травматичного пошкодження структурних елементів великих суглобів.

Таким чином, первинні ушкодження, які викликають біомеханічні зміни у колінному суглобі, вважаються основними чинниками розвитку остеоартрозу. Наприклад, гострі механічні пошкодження (розрив, екструзія), перенавантаження, гіпермобільність або окремі анатомічні відхилення, можуть спричиняти вплив на суглоби і суглобові поверхні постійно діючого низько-інтенсивного пошкодження [60, 61]. Проте, в патогенезі остеоартрозу хронічне запалення та механічні пошкодження розглядаються як індукуючий патогенетичний чинник розвитку даного поліетіологічного захворювання [3].

Враховуючи наведені факти та результати досліджень і, плануючи виконання власного дисертаційного дослідження, нами було проведено вивчення даних літературних джерел, що стосуються питань експериментального відтворення у дослідних тварин остеоартрозу великих суглобів (на прикладі колінних суглобів). Результати проведеної роботи представлені у наступному підрозділі літературного огляду дисертації.

1.2. Особливості моделювання хронічного остеоартрозу великих суглобів у лабораторних тварин

Розробка і впровадження в наукову практику експериментальних моделей остеоартрозу (остеоартриту) на сьогодні – надзвичайно перспективний напрямок у медико-біологічних дослідженнях. Це пояснюється, в першу чергу, значним поширенням і високою соціальною значимістю досліджуваної патології опорно-рухової системи людини [33, 62, 63]. Загальноновживаними вважаються варіанти патогенетично обґрунтованого посттравматичного моделювання остеоартрозу у лабораторних тварин, з метою наступного дослідження ефективності застосування інноваційних технологічних засобів лікування. При цьому, в експериментах використовуються різні види лабораторних тварин, і, в першу чергу, механічне навантаження, оскільки воно вважається домінуючим при розвитку дегенеративно-дистрофічних та запальних процесів у хрящовій тканині суглоба [64, 65, 66]. Саме тому, найбільш клінічно важливим є використання різних науково обґрунтованих

підходів до моделювання остеоартрозу, в першу чергу, великих суглобів і, зокрема, колінного [67, 68].

Експериментально апробована велика кількість подібних моделей, кожній з яких притаманні певні особливості. Насамперед це стосується способів відтворення патології, термінів розвитку, ступенів важкості та динаміки розвитку патологічних процесів. У зв'язку з існуванням значної кількості експериментальних моделей остеоартриту й остеоартрозу, необхідно було в цьому розділі провести класифікацію та узагальнити наявну інформацію із зазначеного питання.

При експериментальному моделюванні остеоартрозу процес перебігу патологічного процесу у тварин є важливою умовою для вивчення та застосування різноманітних специфічних і терапевтично обґрунтованих методик та засобів лікування. Головною задачею експерименту є також отримання культур хондроцитів у позаклітинному середовищі без зміни їх фенотипу, а також отримання культур цих клітин для вивчення їх передчасної, відтермінованої, короткої або тривалої відповіді на дію екстремальних хімічних чи фізичних чинників [33, 62, 67].

Індукція розвитку асоційованих із остеоартрозом деструктивних та дистрофічних порушень у тканинах суглобів може бути досягнута під дією різних екзогенних чинників:

- 1) шляхом введення в суглоб хімічних речовин (стероїдних гормонів, струменю азоту);
- 2) фізичних чинників (наприклад, дії значних навантажень);
- 3) при застосуванні механічних і травматичних тканинних порушень, що призводять до розвитку т.зв. нестабільності суглоба або кількох суглобів.

При моделюванні остеоартрозу травматичного генезу, наприклад, застосовують методику Pond-Nuki [69]. У випадку, коли вивчаються особливості розвитку дегенеративних змін у суглобах ендogenous генезу, використовується класичний спосіб внутрішньосуглобового введення кортикостероїдних препаратів, або інших засобів, що різко порушують

метаболізм хрящової тканини та синовіальної оболонки [69].

Вважається, що моделювання остеоартриту відбувається і за рахунок первинного впливу на суглоб чинників, які викликають суттєве ушкодження його структурних елементів. Добре відомим є спосіб моделювання остеоартрозу за рахунок дворазового внутрішньо-суглобового введення піддослідним білим мишам 1 од. колагенази VII (ферменту, отриманого з *Clostridium histolyticum*) з інтервалом у 2 дні [70]. Ін'єкції цього ферменту супроводжуються поступовим розвитком структурно-функціональних і метаболічних порушень суглобових зв'язок, що викликає розвиток нестабільності самого суглоба. При цьому, верифікований остеоартроз розвивається протягом 6 тижнів, що дуже важливо для проведення відповідних досліджень в цій галузі експериментальної травматології [71].

Введення в колінний суглоб дексаметазону або натрієвої солі моноіодоцтової кислоти також вважається ефективним способом експериментального моделювання остеоартриту у щурів [69, 72]. Ця мета експерименту також може бути досягнута аналогічним застосуванням розчину колагенази і монокристалічного йодацетату (МЙА). Розвиток остеоартрозу і його прогресування вивчалися авторами дослідження у 3 етапи (через 2, 4 та 6 тижнів) після внутрішньосуглобових ін'єкцій цих засобів у правий колінний суглоб дорослих самців щурів. У тварин виявлялись прояви остеоартриту колінних суглобів, які були виявлені при застосуванні гістопатологічних та радіографічних методів дослідження. Найбільш ранніми та характерними змінами ставали набряк і почервоніння тканин правих колінних суглобів експериментальних тварин. В порівняльному плані, при дисекції визначили більш помітне потовщення капсули дослідних суглобів щурів при ін'єкції МЙА, а ніж при використанні колагенази. Дані свідчать також про пришвидшений розвиток радіографічних та гістопатологічних порушень у групі тварин при введенні МЙА. Однак, в обох випадках спостерігався розвиток хронічних дегенеративних процесів, про що свідчили зміни в клітинах, деградація матриксу, субхондральні трансформації та формування

маргінальних остеофітів. Водночас, кількісні результати показали, що в кожному з трьох обраних періодів, при індукції остеоартрозу, вищий показник спостерігався в групі тварин, яким вводили МІА. Таким чином, МІА викликає більш виражені зміни у тварин і за більш короткий час, у порівнянні з колагеназою [72]. Описані варіанти моделювання остеоартрозу є неінвазивними, проте, основним їх недоліком є розвиток загального впливу і системна реакція організму в тварин, що відображається не лише у патологічних змінах, які спостерігаються у скомпроментованих великих суглобах.

Інший спосіб моделювання остеоартриту полягає у введенні один раз на добу в суглоб лабораторних щурів вітаміну А (13,5-13,9 мг/кг маси тіла) протягом 2 діб. Порушення процесів синтезу та резорбції тканин суглобу швидко призводить до розвитку запальних деструктивних змін як у суглобі, так і в параартикулярних тканинах, а також викликає розвиток загальносистемних метаболічних порушень [71].

Інша експериментальна модель остеоартрозу була апробована в результаті стимуляції клітин лінії SW1353 із використанням ІЛ-1 β . Модель була реалізована шляхом внутрішньосуглобової ін'єкції колагенази піддослідним кроликам із подальшою обробкою чинниками/засобами Torin1 або 3-метиладеніном. Одночасно вивчали рівні експресії мРНК ЧРЕС, ММП-13 та тканинного інгібітору матриксних металопротеїназ-1 за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, в той час, як дегенерацію структурних компонентів хряща оцінювали з використанням методу вестерн-блот та імунофлюоресценції за рівнем білків Vec1n-1 і LC3. Ультраструктуру хондроцитів і аутофагосом оцінювали шляхом використання просвічуючої електронної мікроскопії. В результаті доведено, що дегенерація клітин SW1353, хондроцитів і самого хряща пов'язана із втратою клітинами функції аутофагії у досліджуваній авторами моделі остеоартриту. Засіб 3-МА збільшував ступінь дегенерації клітин хряща цим шляхом, в той час, як засіб Torin 1 зменшував розвиток патологічного процесу, завдяки активації реакції

аутофагії. Використання засобу Torin 1 може гальмувати розвиток дегенеративних змін при моделюванні остеоартриту, тобто, активація аутофагії є перспективним напрямком терапії остеоартрозу і остеоартриту [73].

На думку авторів, у хрящовій тканині, що містить практично один тип клітин (хондроцити) і відсутні кровоносні, лімфатичні судини, при розвитку остеоартрозу, порушується трофіка не лише синовіальної рідини, але й утворення низки чинників, що синтезуються хондроцитами та клітинами навколишніх тканин. При цьому спостерігається порушення структури і взаємодії клітин з матриксом, інші прояви перебігу захворювання [74].

Хірургічним способом моделювання остеоартрозу є метод індукції артрозоартриту колінного суглобу у кролів, шляхом видалення латерального виростка стегна [75], а іншим варіантом моделювання є нанесення дефектів суглобової поверхні різного ступеня важкості та пошкодження зв'язкового апарату. Широко використовується, наприклад, спосіб моделювання хронічного артрозу тазостегнового суглобу щурів за допомогою нанесення дефекту суглобового хряща (у вигляді отвору діаметром 2 мм) та субхондріальної кістки [76]. При цьому автори спостерігали розвиток запальних і дегенеративно-дистрофічних змін не лише суглобового хряща, але і зв'язкового апарату, що було викликано механічним травмуванням. Часто у колінному суглобі перетинають передню хрестоподібну зв'язку. Таку методику застосовували в своїх дослідженнях різні автори [77, 78, 79, 80, 81]. Використання даного способу моделювання у щурів, собак і кролів спричиняє деструктивні зміни в суглобовому хрящі та субхондральній кістці, які можуть бути досліджені та детально вивчені лише через 30-40 днів після втручання. Від такого способу моделювання тварини протягом 20-30 днів не здатні спиратися на уражену кінцівку. В цей час в їхніх суглобах спостерігається розвиток або індукція виражених дистрофічних процесів. Крім ураження передньої хрестоподібної зв'язки, автори інноваційних методик також пропонують пошкоджувати й інші елементи суглобу, щоб індукувати порушення

гемодинаміки, мікроциркуляції та метаболізму в тканинах уражених суглобів. До перетину хрестоподібної зв'язки вони пропонують додавати видалення медіального меніска, при моделюванні остеоартрозу пропонують проводити перетин медіальної колатеральної зв'язки і тотальне розсічення меніска [82, 83]. Інші автори, з цією метою, пропонують поєднувати перетин медіальної колатеральної, обох хрестоподібних зв'язок із одночасною резекцією медіального меніска колінного суглоба [84]. Останній варіант супроводжується розвитком вираженої картини перебігу патологічного процесу, індукованого деструкцією, але цей варіант остеоартрозу не є типовим для клінічної картини розвитку у пацієнтів.

Морфологічну оцінку результатів проводять згідно рекомендації Міжнародного товариства досліджень остеоартриту (Osteoarthritis Research Society International – OARSI) щодо розвитку остеоартриту в мишей. При цьому, проводиться статистична оцінка (в балах) чотирьох областей колінного суглобу (медіальне плато великогомілкової кістки, медіальний великогомілковий виросток, латеральне плато великогомілкової кістки та латеральний виросток стегнової кістки). Вважається, що для вивчення етапів розвитку захворювання, важливо проведення експериментів на мишах (поряд із великими тваринами), адже для перших – властивий швидкий розвиток хвороби, що більш актуально для розробки лікування і апробації відповідних засобів лікування різних варіантів розвитку остеоартрозу [85].

При моделюванні остеоартрозу часто використовується механічна травма тканин суглобу, або використовується вплив на них дії низьких температур [86, 87, 88].

Моделювання остеоартрозу можна досягти і без використання прямого впливу різних фізичних чинників на тканини суглоба. Дослідження методу формування остеоартрозу у морських свинок проводилось після проведення двосторонньої оваріоектомії [89]. При цьому ознаки захворювання (за даними ультраструктурних досліджень) виявляються вже через 6 тижнів, а через 12 – візуалізувались важкі дегенеративні пошкодження хряща і зв'язок суглоба [89].

Для апробації засобів і методів лікування може бути використаний наступний спосіб моделювання остеоартрозу у щурів лінії Wistar. Цей опосередкований варіант реалізується шляхом щоденних підшкірних ін'єкцій 0,1 мл 1% розчину мезатону протягом 2-х тижнів. Після ін'єкцій тварини змушені плавати протягом 20 хвилин, їх штучно утримують у тісних клітках впродовж 2 місяців, із використанням висококалорійного харчування (понад 55 % вуглеводів, 30 % жирів та 9 % білків від щоденного раціону). Це забезпечує розвиток остеоартрозу з ураженням суглобового хряща 2-3 ступеня. Цей спосіб моделювання є нетравматичним, враховує етіопатогенез захворювання у пацієнтів, не вимагає спеціального обладнання, або значних витрат часу. Модель характеризується 100 % відтворюваністю, відсутністю прямого впливу токсичних речовин та кортикостероїдних препаратів на тканини суглобів, передбачає опосередковану дію гормонів [90].

Важливе місце займають моделі розвитку т.зв. спонтанного остеоартрозу, розроблені для різних тварин: морських свинок, собак, сирійських хом'яків, лабораторних мишей, які часто застосовуються в експериментальних дослідженнях [91, 92, 93, 94, 95]. В першу чергу, це стосується дослідів із генетично модифікованими трансгенними мишами, в яких розвивається передчасна дегенерація хряща [96, 97].

Динаміку перебігу і активність остеоартрозу можна регулювати, корегуючи навантаження, або вплив інших чинників на уражений суглоб. На моделі спонтанного остеоартрозу було продемонстровано, що у морських свинок, в умовах низькокалорійної дієти, остеоартроз розвивається поступово і протікає менш важко [64]. Автори іншої моделі пропонують модифікувати важкість виникаючих змін, шляхом додаткового перетину передньої хрестоподібної зв'язки та видалення медіального меніска, за рахунок зростання інтенсивності і тривалості фізичного навантаження на тканини ушкодженого суглоба [98].

У процесі планування власної експериментальної роботи, з метою критичного аналізу переваг та недоліків існуючих моделей остеоартрозу та

проведення власного дисертаційного дослідження, вдалося умовно поділити їх на основні групи, в першу чергу, виокремивши нехірургічні та хірургічні способи моделювання (табл. 1.1).

Нехірургічна група моделей, відрізняючись т.зв. «неінвазивністю», в той же час характеризується суттєвим недоліком. Для розвитку виражених патологічних змін хрящової тканини необхідний досить тривалий час, а контрлатеральний суглоб неможливо використовувати в якості неушкодженого, тобто мають місце системні ураження не лише опорно-рухового апарату, але і розвиток системних змін в організмі тварин [99].

Аналізуючи хірургічні моделі остеоартрозу, можна підкреслити, що в цьому випадку прямий вплив на суглоб здійснюють за рахунок: 1) введення хімічних речовин; 2) застосування фізичних чинників; 3) нанесення механічної травми. Суттєвим недоліком таких моделей слід вважати їх досить високу травматичність, розвиток афункціональності кінцівок, ризик інфікування ураженого суглоба.

Таким чином, у патогенезі остеоартрозу домінують суттєві порушення балансу між катаболічними й анаболічними реакціями, що супроводжуються деградацією хрящової тканини, втратою хрящем відповідних амортизаційних властивостей. Встановлені порушення співвідношення колагену, протеогліканів і води, в результаті чого, поступово знижуються механічні здібності хрящової тканини. Поліетиологічність остеоартрозу, в той же час, потребує тривалого впливу патогенетичного чинника, застосованого при моделюванні експериментатором. При цьому прогресування остеоартрозу супроводжується розм'якшенням, «розпушенням» хряща, в якому з'являються тріщини до самої кістки. В умовах деструкції хрящової тканини кісткові суглобові поверхні відчувають підвищене та нерівномірне механічне навантаження, в субхондральній частині виникають зони підвищеного динамічного навантаження, що викликає порушення кісткової мікрогемодинаміки. Це супроводжується мікропереломами, розвитком субхондральних остеоосклерозів, кістковидними перебудовами, зміною кривизни суглобових поверхонь. Пізніше,

це призводить до утворення кістково-хрящових патологічних новоутворень – остеофітів [100].

Таблиця 1.1

Основні варіанти моделювання остеоартрозу у дослідних тварин

Підхід у моделюванні	Характер впливу на суглоб	Маніпуляції
Хірургічні	Порушення біомеханіки суглобу	Перетин передньої хрестоподібної зв'язки [77, 78, 79, 80, 81] Розсічення або видалення меніска [82] Розсічення або видалення меніска з порушенням зв'язкового апарату [98]
	Деструкція суглобової поверхні	Формування хрящового або кістково-хрящового дефекту [76]
Нехірургічні	Спонтанний остеоартроз [64]	
	Введення у суглоб хімічних речовин	Вітамін А [71] Стероїдні гормони [69] Моноіодоцтова кислота [72] Ферменти (колагеназа, папаїн) [70]

Розглянемо в якості прикладів дослідження, в процесі виконання яких, не лише вивчався патогенез розвитку остеоартрозу у піддослідних тварин, але і варіанти корегуючого впливу на його перебіг. Експериментально-хірургічний спосіб моделювання остеоартриту у щурів лінії Wistar (як зазначалось вище) успішно здійснювався хірургічним шляхом медіальної меніскектомії, що було схвалено Європейським комітетом з етики (CAPPesq) (№ 690/98). Дорослі самці щурів лінії Wistar (n=70, віком від 8 до 16 тижнів і ваговим діапазоном від 180 до 360 грамів) були розподілені на чотири групи – контрольні та три дослідні. Результати проведеного дослідження показали, що ця експериментальна модель хірургічної меніскектомії є ефективною для подальшого лікування м'якої форми остеоартриту у щурів через 3 місяці, і, відповідно, важкого остеоартриту

через 7 місяців після операції. Використання лікарських засобів діацерину внутрішньосуглобової ін'єкції гіалуронової кислоти одночасно у сукупності не покращує результатів лікування, в порівнянні з використанням кожного засобу, з метою лікування, окремо [101].

В інших дослідженнях остеоартроз у білих щурів моделювали шляхом внутрішньосуглобового введення 10 % суспензії стерильного тальку і потім вводили ЗТП (0,2 мл 1 раз на тиждень, 3 рази через 30 днів після введення суспензії тальку) [68, 69]. Дія ЗТП позначилась у збільшенні об'ємної щільності хондроцитів на $18,4 \pm 2,0$ % ($p < 0,05$). Незважаючи на виявлення в суглобовому хрящі лакун і хондроцитів, із утвореними апоптозними тільцями, зростала також кількість як окремо розташованих хондроцитів, так і їх ізогенних груп в усіх зонах хряща. Очевидно, що тромбоцити впливають на перебіг остеоартрозу, завдяки вмісту значної кількості речовин, що приймають участь в дії на перебіг фази запалення. Вони впливають на розвиток остеоартрозу, моделюють тривалість і активність цього захворювання. При моделюванні остеоартрозу в колінних суглобах статевозрілих щурів лінії Wistar, виникають грубі структурні порушення суглобового хряща протягом всього періоду, аж до стадії повного руйнування, що супроводжується процесами апонекрозу хондроцитів із одночасною проліферацією та розвитком гранульоматозного запалення. Слід зазначити, що регенеративно-відновлювальну дію ЗТП та препаратів гіалуронової кислоти на гальмування запального процесу і проліферацію клітинних елементів у тканинах суглобів, до сьогодення часу, вивчено недостатньо, хоча перспективи їх використання досить значні [102].

Введення ЗТП дослідним тваринам з експериментальним остеоартрозом знижує вираженість проявів дегенеративно-дистрофічних змін, здійснює виражену хондропротективну дію. Самостійне застосування ЗТП, або послідовне введення ЗТП і гіалуронової кислоти, спричиняють більш помітний позитивний вплив на розвиток репаративних процесів у хрящовій тканині

великих суглобів, у порівнянні з внутрішньосуглобовим введенням тільки препарату гіалуронової кислоти [103].

Таким чином, експериментальні способи моделювання остеоартрозу у щурів є корисними, адже не вимагають використання генномодифікованих тварин, значних витрат часу та можуть бути виконані в стандартних умовах віварію. Такі моделі дозволяють проводити вивчення розвитку не лише ранніх, але і відтермінованих етапів патогенезу остеоартрозу, а також можливість застосування нових засобів і методів лікування цієї нозології.

При моделюванні остеоартрозу автори повинні враховувати такі чинники ризику виникнення цього захворювання у людей як вік, стать, механічні та гормональні чинники [17, 50, 66]. Чим більше чинників передбачено у процесі розробки експериментальної моделі, тим активніше формуються зміни хрящової тканини та інших структурних елементів суглоба. Під час емпіричного моделювання остеоартрозу необхідно, щоб тварини були одного віку (статевозрілі тварини), не мали захворювань, які були б здатні вплинути на перебіг дегенеративних змін у тканинах суглобів. Але, жодна із запропонованих моделей остеоартрозу не в змозі відтворити патологічний процес, ідентичний такому, що спостерігається при остеоартрозі у пацієнтів і, в першу чергу, неможливо оцінити головний симптом – біль у суглобах [67]. До того ж, під час моделювання остеоартрозу у тварин, додатково не враховується ряд чинників, які суттєво прискорюють розвиток та прогресування цього асоційованого із віком захворювання, вертикального положення тіла людини і слабкості периартикулярних м'язів [67].

У зв'язку із цим, експериментальні моделі остеоартрозу ґрунтуються, як правило, на домінуванні однієї із ланок етіопатогенезу цієї нозології. Огляд наукової літератури засвідчив, що такими ланками, в першу чергу, слід обирати травматичне ураження тканин суглоба для збільшення глибини ураження, травму хрестоподібної зв'язки, пошкодження суглобових хрящів, тканин капсули. Більш ефективним є одночасне використання декількох уражаючих чинників, щоб викликати розвиток стабільної моделі остеоартрозу у великих

лабораторних тварин. Наприклад, доведена висока спроможність НПЗЗ викликати розвиток артриту в мишей і щурів. В той час, як у людини вони не відіграють ролі фундаментального чинника у патогенезі захворювання і, навпаки, їх дія супроводжується обмеженим лікуванням симптомів цієї хвороби [104].

Відсутність ідентичності експериментальної моделі остеоартриту і остеоартрозу у пацієнтів пов'язана з тим, що етіологія та тонкі механізми патогенезу захворювання, на сьогоднішній день остаточно не вивчені. Водночас, відмова від проведення експериментів унеможливорює пошук нових фармакологічних агентів, вивчення їх ефективності. Це може призвести до втрати потенційно високоефективних і специфічних терапевтичних засобів для лікування людини.

Найбільш придатними серед тварин, для розвитку та дослідження посттравматичних і дегенеративних змін у тканинах суглобів, є вівці. Це пов'язано із структурною і функціональною схожістю суглобів тварин із такими, як у людини та можливістю проведення оперативних втручань, аналогічних тим, що використовуються у травматологічній клініці (артроскопія, ендопротезування) [105].

Експериментальні моделі представляють найбільшу цінність при дослідженні ефективності інноваційних засобів і препаратів, що «модифікують захворювання» [106]. При розробці технологічних аспектів моделювання остеоартрозу великих суглобів, необхідно також орієнтуватись на вивчення важливих ланок патогенезу, визначення ефективності лікувальних заходів або вирішення обох завдань одночасно. Найчастіше метою таких робіт стає отримання вираженого деструктивного процесу суглобових поверхонь і більш глибоких шарів у найкоротші терміни. При цьому, автори користуються способами, що передбачають деструкцію не лише суглобової поверхні, але і порушення субхондральної кісткової пластинки. Для оцінки впливу лікувального засобу (чинника) на елементи суглобу, з метою мінімальної

травматичності процедури, рекомендується проведення терапії остеоартрозу, шляхом інтраартикулярних ін'єкцій засобів для корекції патологічних процесів.

Динаміка відновлення травматично пошкодженого суглобового хряща і субхондральної кістки виростків стегнових кісток при моделюванні остеоартрозу колінного суглоба в овець, при стандартизації локалізації та площини дефекту, залежить також і від глибини ураження. Відновлення уражених патологічним процесом суглобового хряща та субхондральної кістки латерального і медіального виростків стегна вівці розрізняються у зв'язку з важливою функціональною роллю стегно-гомількової зв'язки латерального виростка [107]. При цьому використання штучного збільшення фізичного навантаження на суглоби тварини, шляхом обтяження (10 кг, що дорівнює 1/3 її ваги), одночасне збільшення впливу на один із тазостегнових суглобів тварини, за умов ендопротезування іншого суглобу, призводить до швидкого розвитку дегенеративно-дистрофічних змін компонентів тазостегнових суглобів у овець, аналогічних тим, що спостерігаються при остеоартрозі у людини. Дана модель може бути використана для розробки ефективних комбінованих методів лікування ідентичних захворювань людини.

Важливою ланкою етіопатогенезу остеоартрозу, на яку звертали мало уваги автори або не вивчали в достатній мірі, стало, на наш погляд, травматичне ушкодження тканин суглоба, особливо комбіноване пошкодження зв'язкового апарату і суглобового хряща. Патологічні зміни полягають у розвитку спочатку локальних (деформація меніска, гіалінового хряща) і далі системних порушень (порушення мікроциркуляції і поява у крові продуктів пошкодження тканин суглоба). Доказом цього є розвиток остеоартрозу при введенні глюкокортикоїдних (стероїдних) гормонів, навіть без травматичного дефекту хряща суглоба. Більше того, в умовах порушеного гомеостазу в тканинах суглобів, відбуваються й інші значні зміни сполучної тканини, коли починає переважати фіброзний варіант трансформації хрящової тканини, але при цьому гіпоксично-ішемічний варіант пошкодження стосується не лише хрящової, але й інших тканин суглобів. Всі вищезазначені наукові передумови

дозволили зробити обґрунтоване припущення про можливість розробки нової моделі остеоартрозу, яка б дозволила одночасно використати дві найпотужніші ланки патогенезу остеоартрозу в експериментальних умовах: політравматичний та дисциркуляторний чинники, коли кожен з них самостійно здатний викликати порушення у колінному суглобі.

1.3. Аналіз та порівняння ефективності існуючих засобів терапії експериментального остеоартрозу колінних суглобів

Метою лікування остеоартрозу колінних суглобів у пацієнтів є суттєве зниження больових відчуттів, реалізація протизапальної дії, збільшення або збереження існуючого, на момент діагностування захворювання, діапазону рухів, мобільності кінцівок у суглобах, а також поліпшення якості життя пацієнтів. Останнє пов'язано, в першу чергу, із організацією охорони здоров'я у кожній окремо взятій країні [12].

При цьому основні науково обґрунтовані стратегії терапії остеоартрозу у хворих можна класифікувати за типом функціональності, конкретними засобами лікувальної дії, тощо [12]. До цих засобів і технологій із наявністю доведених під час Good Clinical Practice (GCP) досліджень лікувальних ефектів, в першу чергу, слід віднести анальгетики і НПЗЗ, сучасні біологічні (антицихлінові) засоби, трансплантацію стовбурових клітин і окремо виконані хірургічні процедури.

На сьогодні використовуються етіопатогенетично обґрунтовані методи лікування остеоартриту: НПЗЗ (Celebrex, Ібупрофен, Naproxen), знеболюючі препарати (ацетамінофен/парацетамол, опіоїди (трамадол), а в деяких випадках – тканинносумісні глюкозаміни, або хондроїтин-вмісні засоби. Протизапальні препарати здатні інгібувати дію внутрішньоклітинних сигнальних молекул і медіаторів, до яких відносяться ЧНП- α , циклооксигенази 1/2, ядерний чинник карра В, деякі простагландини. Відновлення хряща великих суглобів може бути досягнуто завдяки додаванню деяких компонентів хондроїтину сульфату і глюкозаміну, що є сучасною стратегічною лінією лікування остеоартрозу. В той

період, як короткострокова та часткова ремісія захворювання досягаються завдяки використанню стероїдних препаратів, довгострокові результати такого лікування мають велику кількість негативних наслідків. Аналогічно цьому, сучасні НПЗЗ здійснюють протизапальну дію, демонструючи одночасно і негативні ефекти, серед яких чинне місце займають: ризик кровотечі або розвиток гострих серцево-судинних захворювань. Знеболюючі засоби (ацетамінофен) характеризуються гепатотоксичністю, ризиком розвитку гострого ураження паренхіматозних органів, а опіоїди, зазвичай, не підходять для тривалого застосування. Результати проведених досліджень із застосуванням глюкозаміну та хондроїтину сульфату в пацієнтів, свідчать про помірну ефективність лікування цими засобами остеоартриту, а дані емпіричних випробувань також не відобразили особливої користі їх використання. Таким чином, лікування остеоартрозу потребує пошуку більш безпечних лікарських засобів, здатних впливати на велику кількість ланок патогенетичних механізмів остеоартриту, одночасно з наявністю мінімальних побічних ефектів, особливо протягом тривалого періоду застосування. Однією з таких молекул є астаксантін – нешкідлива, орально біодоступна молекула, яка широко розповсюджена в засобах рослинного походження та характеризується потужною антиоксидантною і протизапальною дією [12].

Таким чином, до першої групи анальгетиків відносяться сучасні протизапальні засоби (НПЗЗ), кортикостероїди), що часто використовуються для внутрішньосуглобової терапії) [12]. Було встановлено, що застосування комбінації «потрійної» терапії хондропротектором, препаратом системної ферментотерапії, НПЗЗ, а також «подвійної» терапії препаратом системної ферментотерапії та диклофенаку сприяє однаково вираженому ефекту на редукцію основних симптомів остеоартрозу – больового синдрому, порушення функцій та запалення [108].

Висококомплементарна внутрішньосуглобова терапія здійснюється за рахунок ін'єкції деяких речовин (наприклад, на основі гіалуронової кислоти), які сприяють кращому ковзанню поверхонь суглобів, відновленню в'язкості

синовіальної рідини.

Сучасними терапевтичними засобами, що активно використовуються для лікування остеоартрозу великих суглобів, стали окремі біологічні засоби (антитіла до антитіл чинника росту нерва та ЧНП- α), що використовуються переважно для лікування ревматоїдного артриту, але мають певну користь застосування і при остеоартрозі [12]. Відповідно до того, що ІЛ-1 є одним із медіаторів запалення при остеоартрозі, що блокує активність трансформуючого чинника росту β та інсуліноподібного чинника росту 1. Застосування даних чинників росту в терапії пацієнтів з остеоартрозом може сприяти зменшенню запалення. Але даний підхід виявився неефективним, у зв'язку з занадто коротким періодом напіврозпаду цих чинників, що не дозволило тривало підтримувати терапевтичний ефект [109].

Використання ін'єкцій ЗТП, продуктів плазми стовбурових клітин та хрящової тканини, супроводжується поступовим регресом або уповільненням прогресування захворювання.

Хірургічні процедури, що включають артроскопію з промиванням і/або санацією суглобових поверхонь, часткову або загальну артропластику (заміну суглобу), є високоефективними для лікування остеоартрозу та можуть бути рекомендовані для випадків, коли вищезазначені терапевтичні медикаментозні процедури та засоби виявились не ефективними.

До другої групи засобів і технологій (без доведеної експериментально і клінічно терапевтичної дії) відноситься застосування дієтичних добавок, що вміщують глюкозамінглікани з хондроїтином і трав'яними сумішами – т.зв. «модифікатори перебігу захворювання» [110, 111, 112], аюрведичних препаратів та акупунктури, фізичних методів лікування (силових вправ [113, 114, 115, 116, 117, 118]; аеробних вправ [119, 120, 121], фізіотерапевтичних електростимуляційних технологій, термо- і акватерапії, а також масажу [122], гімнастики «тай чі» [123] і хіропрактики), застосування ортезів, спрямованих на сповільнення прогресування остеоартрозу великих суглобів (в першу чергу, колінного), впливаючих на м'язову систему та діапазон рухів в ураженому

суглобі та, нарешті, корекцію ваги тіла, в бік її зменшення, з метою протекторного впливу на тканини ураженого суглоба [12].

Серед сучасних варіантів терапії остеартрозу виділяють іноваційні молекулярно-генетичні методи, наприклад, запобігання втраті або відновлення втрачених локусів генів, що кодують синтез захисних білків або інгібування експресії молекул, які індукують розвиток остеартрозу, запальних процесів або реакцій, задіяних в метаболізмі хондроцитів [124]. Проте, для розробки терапевтичного підходу, і прийняттого для використання в клінічних умовах, необхідні засоби, що будуть впливати на суглобові тканини та перебіг у них запальних процесів. В цьому аспекті важливий пошук чинників і засобів, які б впливали на різні мішені, включаючи субхондральну кістку та синовіальний шар клітин суглобів [125].

Використання глюкозаміну з хондроїтином у пацієнтів, показало значний терапевтичний вплив на больовий синдром і функціональність великих суглобів у середньостроковій перспективі. Проте, використання тільки цих засобів для терапії остеартрозу, не виявило жодних переваг, у порівнянні з іншими засобами [12]. Дослідження, проведене в Індії на 117 пацієнтах з надмірною вагою із остеартрозом колінного суглоба, показало, що терапія глюкозаміном (1500 мг на добу), хондроїтином сульфатом (1200 мг на добу) та низькокалорійною дієтою, суттєво зменшувала прояви больового синдрому, ніж використання тільки низькокалорійної дієти [110]. Результати дослідження, спрямованого на порівняння ефективності та безпечності застосування глюкозаміну гідрохлориду, хондроїтину сульфату та целекоксибу, проведеного на 603 пацієнтах, показали, що терапія «глюкозамін гідрохлорид + хондроїтин сульфат» не виявила різниці у послабленні проявів больового синдрому, в порівнянні з целекоксибом [111]. Також, отримані результати рандомізованого дослідження, проведеного на 164 пацієнтах, в рамках якого хворі отримували глюкозамін у дозі 1500 мг на добу і хондроїтин сульфат у дозі 1200 мг на добу, або плацебо протягом 6 місяців. Використання плацебо полегшувало біль при остеартрозі суттєвіше, ніж поєднане використання глюкозаміну-хондроїтину

[112].

Також, існує ряд препаратів та діючих речовин для усунення функціональних порушень суглобових поверхонь хряща, які включають гідролізат колагену, біофлавоноїди або їх стереоізомери [126, 127, 128].

Згідно з результатами досліджень, лютеолін є ефективним інгібітором дії ліпоксігеназ, стимулюючих синтез ЧНП- α , ІЛ-6. При порівнянні інгібуючої здатності лютеоліна з іншими флавоноїдами – кверцетином, міріцетіном, хризіном, апігеніном і таксіфоліном, було встановлено, що тільки лютеолін ефективно пригнічує виробництво ЧНП- α та зменшує розвиток різних видів запальних набряків. Це спостерігається при пероральному застосуванні засобу в тварин, навіть у низьких концентраціях [129].

Ефективність клітинно-трансплантаційної терапії остеоартрозу в експериментальних умовах була підтверджена неодноразово [130]. Використання терапії ЗТП у вигляді різних форм, в даний час, міцно посіло своє місце в клінічній практиці. Через універсальність механізму дії даного підходу, він застосовується в різних галузях медицини. До переваг методики можна віднести її безпеку та низьку собівартість [131]. Відомо, що у випадках ушкоджень нервового стовбура, що супроводжується інтенсивним больовим синдромом, розвитком вираженого післятравматичного або післяопераційного рубцевого оточення ділянки нерва, доцільно виконувати його відновлення, застосовуючи засоби стимуляції регенерації нерва і профілактики вторинної адгезії та компресії, шляхом формування муфти з аутологічної суспензії жирової тканини у ЗТП, з фіксацією її аутотромбіном [102, 132].

Серед терапевтичних підходів, заснованих на цій науковій основі використання клітин, лише терапія ЗТП показала статистично достовірний ефект (у порівнянні з ін'єкціями фізіологічного розчину). Цей ефект проявлявся зменшенням інтенсивності болей, покращенням якості життя у середньостроковій перспективі – протягом 6 місяців після проведеної терапії [12]. При цьому, використання ін'єкцій ЗТП, продуктів плазми, стовбурових клітин та хрящової тканини, дія яких супроводжуються

поступовим регресом або уповільненням прогресування захворювання, виглядає як перспективний напрямок роботи, якому присвячений наступний підрозділ дисертаційного дослідження [12].

За даними проведеного дослідження, 78 пацієнтів якого були розділені на три групи: I група – особи якої, одержували одну ін'єкцію ЗТП, II група – особи якої, отримали дві ін'єкції: одну – на базовому рівні захворювання і другу – через 3 тижні, та контрольна група – пацієнти якої, отримали фізіологічний розчин. Після 6-тижневого терміну у пацієнтів, що отримали лікування, спостерігалось статистично достовірне зменшення больових відчуттів, у порівнянні з даними, що мали місце до початку лікування, так і у порівнянні з контролем (MD-5,22 для групи осіб з однією ін'єкцією, MD-5,10 для групи осіб з двома ін'єкціями) [133]. Результати рандомізованого дослідження, проведеного на 65 пацієнтах з 1-м або 2-м ступенем розвитку остеоартрозу (експериментальна група), які отримували три ін'єкції ЗТП на тиждень, протягом 6 тижнів та контрольна група, пацієнти якої, отримували 500 мг ацетамінофену (3 рази на день), показали суттєве зменшення інтенсивності болю саме у пацієнтів експериментальної групи (MD-2,20) [134].

Пацієнти з посттравматичною хондропатією, які пройшли курс інтраартикулярного введення ЗТП протягом 6 місяців, не виявили будь-яких побічних ефектів і ускладнень при такому методі лікування та характеризувалися достовірно високими значеннями показників субшкал тесту KOOS (Knee injury and osteoarthritis outcome score): «Щоденна активність» ($p < 0,01$); «Спорт, активний відпочинок» ($p < 0,01$); «Якість життя» ($p < 0,01$) і підсумковим значенням за шкалою KOOS ($p < 0,01$), порівняно з пацієнтами контрольної групи [135]. Терапія ЗТП протягом 6 і 12 місяців також показала суттєве покращення загального стану, зменшення болей та покращення якості життя всіх пацієнтів з остеоартрозом ($p < 0,01$) [136]. Проте, в іншому дослідженні, проведеному на 42 пацієнтах, була показана незначна різниця між особами, що отримували ЗТП, та контрольною групою, хворих на остеоартроз, яка отримувала парацетамол (MD-9.00) [137]. Висока ефективність дії клітинної

терапії із використанням мезенхімальних клітин при остеоартрозі у експериментальних та клінічних умовах, одночасно із існуванням великої кількості даних механізму дії зазначених терапевтичних технологій і патогенезу цього захворювання, стали об'єктивною передумовою проведення власного дисертаційного дослідження. Отримані результати роботи представлені в наступних розділах дисертації.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальна модель остеоартрозу

Експериментальне дослідження проводилось на кролях породи Шиншила, вагою 3,0-4,0 кг. Тварини утримувались в умовах віварію, в окремих клітках, з вільним доступом до води та гранульованого стандартного комбінованого корму. Остеоартроз моделювався шляхом механічного пошкодження суглобової поверхні великогомілкової кістки та нестабільності суглоба. Для цього тварин наркотизували тіопенталом натрію в дозі 60 мг/кг (внутрішньоочеревинно). Тварин у стані наркотичного сну фіксували в положенні на спині. Ділянку шкіри навколо колінного суглоба голили та зрошували Бетадином (Egis, Угорщина). Скальпелем здійснювали доступ до колінного суглоба через медіальну поверхню, перетинали медіальну зв'язку, чим досягали нестабільність суглоба. Шляхом циркулярних обертів низькообертним приводом з модифікованою спицею Ілізарова з напайкою, завдавали пошкодження в центральній ділянці суглобової поверхні (швидкість обертів 1000 ± 5 об/хв). Стандартизована площа ураження – $2,0 \times 2,1$ мм. Епіфізарну поверхню стегнової кістки залишали інтактною. Суглобову сумку зашивали шовним матеріалом 3-0 "Prolene" ("Ethicon," Scotland). По поверхні суглобової сумки здійснювали термічну коагуляцію кровоносних судин, з метою створення регіонарного ішемічного пошкодження. Площа термічного ураження 9,5-10,0 мм². Шкіру на рівні доступу також зашивали матеріалом 3-0 і зрошували розчином Бетадину. Після моделювання остеоартрозу, тварин розділили на дві основні групи. У тварин першої групи досліджували динаміку розвитку структурних порушень у тканинах. Для цього прооперованих тварин виводили з експерименту через 1,5 і 2,5 місяці. У дослідних кролів другої групи через 45 діб після операції у суглобову сумку вводили клітинні суспензії і через 1 місяць (тобто 2,5 місяці після операції)

виводили з експерименту для дослідження розвитку відновних процесів у суглобі. Лабораторних тварин виводили з експериментів шляхом швидкої декапітації. Використаний спосіб моделювання остеоартрозу є власною розробкою, на яку отримано Патент на корисну модель № 130791 (“Спосіб моделювання хронічного остеоартрозу колінного суглоба у кролів” від 26 грудня 2018 року) [138].

2.2. Способи отримання клітинних лікувальних засобів

ЗТП тваринам у суглобову порожнину одноразово вводили у об’ємі 0,5 мл (рис. 2.1). Забір донорської крові проведено у ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України” відповідно до ліцензії Міністерства охорони здоров’я України.

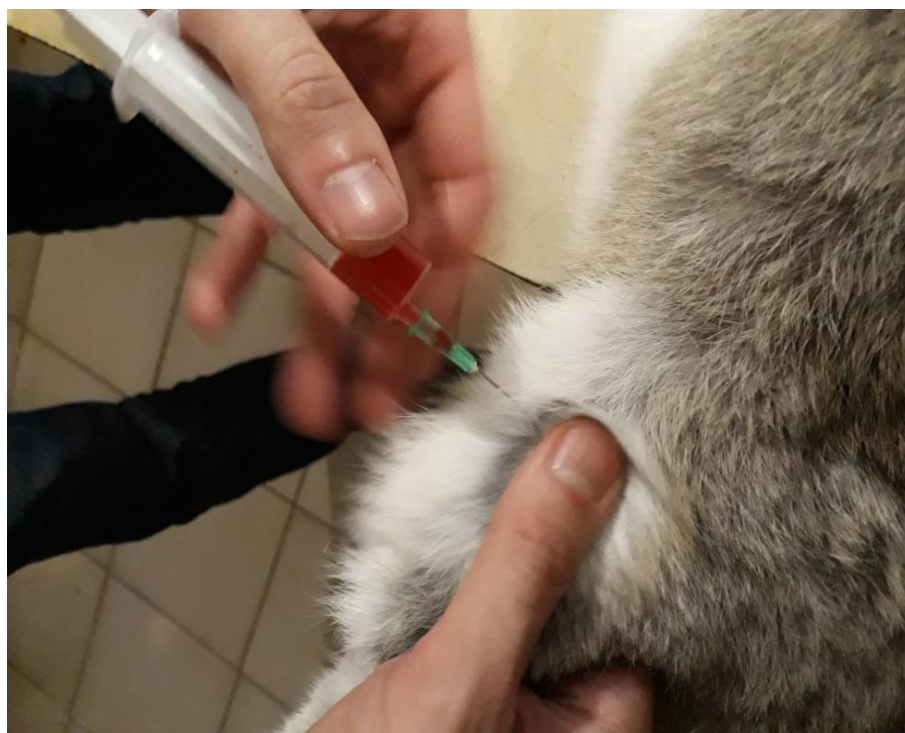


Рис. 2.1. Фото введення ЗТП у колінний суглоб іпсилатеральної кінцівки кролика. Термін введення – 45 доба після моделювання остеоартрозу.

Для отримання ЗТП венозну кров здорових осіб збирали у стерильні

пластикові пробірки об'ємом 10 мл, які містили антикоагулянт (3,8 % цитрат натрію) та центрифугували при 400 g 15 хв ($t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), як це описано у стандартному протоколі [139]. Для введення здійснювали забір шару ЗТП над еритроцитарною масою. Концентрація тромбоцитів $0,8-1 \times 10^6$ 1/мл. Використання донорської крові для отримання ЗТП не суперечить методиці, а дію гетерологічної крові у кролів показано у публікаціях [140, 141].

Клітини аутологічного аспірату кісткового мозку у суглобову порожнину одноразово вводили в об'ємі 1 мл. Забір аутологічного аспірату здійснювали голкою з троакаром із проксимального відділу стегна – ділянки великого вертлюга (2 мл). До аспірату кісткового мозку додавали цитрат декстрази (1:8) для утворення суспензії аспірату кісткового мозку, як це показано у публікації [142].

Клітинний аутологічний аспірат жирової тканини у суглобову порожнину одноразово вводили в об'ємі 1 мл. Аутологічну жирову тканину видаляли з ділянки великого сальника, через 1 см доступ до черевної порожнини. Після цього отриману жирову тканину подрібнювали та гомогенізували шляхом 10 кратного пропускання через 1-мл канюлю.

У дослідженні було використано 6 груп тварин. Їх розподіл у різні групи і проведення маніпуляції наведено у таблиці 2.1. Впродовж всього терміну експериментів проводили макроскопічне дослідження колінного суглоба дослідних тварин. На 30-45 добу після операції у тварин відмічали набряк тканин, порушення біомеханіки і контрактуру суглоба.

2.3. Протокол гістологічного дослідження

Після виведення тварин з експерименту виділяли колінний суглоб. Анатомічні утворення суглобу (капсулу, меніск, епіфіз великогомілкової і стегнової кістки) фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну.

Експериментальні групи тварин

Група	Термін спостереження	Маніпуляції
Контроль	2,5 місяці	–
Остеоартроз	1,5 місяці	Наркоз, пересічення МЗ, дефект ВК
Остеоартроз	2,5 місяці	Наркоз, пересічення МЗ, дефект ВК
Остеоартроз + ЗТП	2,5 місяці	Наркоз, пересічення МЗ, дефект ВК, введення ЗТП у суглобову порожнину
Остеоартроз + аспірат кісткового мозку	2,5 місяці	Наркоз, пересічення МЗ, дефект ВК, введення клітин аспірату кісткового мозку у суглобову порожнину
Остеоартроз + аспірат жирової тканини	2,5 місяці	Наркоз, пересічення МЗ, дефект ВК, введення аспірату гомогенізованої жирової тканини у суглобову порожнину

Примітки:

1. МЗ – медіальна зв'язка.
2. ВК – великогомілкова кістка.

Після фіксації зразки промивали у проточній воді, щоб позбутися формаліну. Капсулу суглоба та меніски зневоднювали й ущільнювали у парафіні (Leica Surgipath Paraplast Regular). Протокол дегідратації: розчини етанолу (від 70 % до 100 %), діоксан, ксилол, ксилол/парафін (1 : 1; 37 °С), парафін (56° С). Парафінові зрізи органів товщиною 8 мкм виготовляли на мікротомі Microm HM 360 (Thermo Scientific, Німеччина) Зрізи депарафінували, регідратували та забарвлювали гематоксиліном-еозином за стандартною методикою. Окремо виділяли епіфіз стегнової та великогомілкової кісток.

Зразки промивали у проточній воді та проводили їх декальцинацію у розчині OsteoFast 2 (BioGnost Ltd., Хорватія) (використовувались 3 зміни декальцинуючого розчину).

Після завершення декальцифікації, проби промивали водою. Частину зразків після дегідратації у етанолі заливали у парафін, з іншої частини зразків отримували кріозрізи товщиною 20 мкм. З парафінових блоків отримували зрізи товщиною 15 мкм на мікротомі Thermo Microm HM 360, забарвлювали гематоксиліном та еозином. Кріозрізи забарвлювали толуїдиновим синім, за методикою Шморля. Гістологічні зрізи вміщували під покривне скельце в синтетичний бальзам. Гістологічні препарати досліджували на мікроскопі Olympus BX 51 (Японія).

Морфометричне дослідження полягало у загальноморфологічній оцінці колінного суглоба та лінійній оцінці суглобової поверхні. Першу проводили за методикою, яку описано у публікації Fitzgerald J. (2008) [143]. Структурні зміни оцінювали у балах згідно шкали, яка репрезентує ступінь пошкодження анатомічних утворень суглоба. В шкалу включено 4 показники: зміни клітинної морфології (0-4 бали), рівень забарвлення матриксу хряща (0-3), регулярність поверхні (0-3), товщину хряща (0-2) та інтеграцію з нативним хрящем (0-2). Максимальна кількість балів за шкалою 14, мінімальна 0, що відповідає повній деструкції хрящової поверхні епіфіза кістки. Методологічний підхід дозволив отримати узагальнену картину якісних та кількісних змін суглобової поверхні.

Другий підхід полягав у морфометричній оцінці суглобового хряща та субхондральної кісткової тканини. Обрано два головні параметри, на основі яких оцінювали ступінь пошкодження: товщина перифокального хряща (мкм) і щільність субхондральної кісткової тканини (%). Перший показник вимірювали як відстань (у сагітальній проекції) від контуру хрящової поверхні до межі хрящ-кісткова тканина (мкм) (при збільшенні $\times 100$, $\times 200$). Для вимірювання другого показника, кожен мікропрепарат епіфіза кістки фотографували при збільшенні $\times 40$. За допомогою програмного забезпечення CarlZeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) визначали кількість кісткової тканини у рандомно відібраних

мікропрепаратах (по контуру кісткових трабекул) і представляли як відносну її кількість щодо загальної площі у досліджуваному мікропрепараті (8-12 зрізів на зразок).

2.4. Протокол біохімічного дослідження

Після декапітації здійснювали забір периферійної крові для біохімічного дослідження. З цільної крові отримували сироватку.

Арилестеразну активність параоксонази-1 (ЕС 3.1.1.2) визначали спектрофотометрично, за швидкістю перетворення фенілацетату на фенол при 270 нм [145].

Пероксидазну активність мієлопероксидази (ЕС 1.11.1.7) в плазмі крові оцінювали за окисненням хромогенного субстрату 3,3'-диметоксибензидин ("Acros organics", Бельгія) (3,8 мМ). Для виключення можливого впливу на результат інших пероксидаз, у плазму додавали інгібітор МПО – гідразид 4-амінобензойної кислоти ("Acros organics", Бельгія) (50 мкМ). Реакцію запускали додаванням H_2O_2 у концентрації 100 мкМ і в кінетичному режимі протягом 68 хв реєстрували швидкість зниження оптичної густини при 460 нм ($\Delta_{460}/xв$) на СФ-46 при 23 °С [146].

Активність лейкоцитарної еластази (ЕС 3.4.21.37) визначали за швидкістю гідролізу N-тетра-бутоксикарбоніл-аланін-*p*-нітрофенілового ефіру (BOC-Ala-ONp) ("Sigma", США) спектрофотометрично при 347 нм [147].

СОД активність (ЕС 1.15.1.1) визначали за зниженням інтенсивності аутоокислення адреналіну в адренохром [148]. Швидкість спонтанного окислення адреналіну визначали спектрофлуорометрично (510 нм emission, 410 нм excitation), додаючи до інкубаційного середовища (0,1 мМ ЕДТА, 0,05 М Na_2CO_3) 1 мМ розчин адреналіну ("Sigma", США) в 0,1 N HCl.

Активність каталази (ЕС 1.11.1.6) в пробах визначали спектрофотометричним методом за здатністю H_2O_2 утворювати стійкий

забарвлений комплекс із солями молібдену за методом [149].

Вміст продуктів, що реагують із тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти), визначали спектрофотометрично за методом [150].

Вміст продуктів окисної модифікації білків визначали спектрофотометрично, за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків білків із 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідразона [151].

Вміст церулоплазміну визначали спектрофотометричним методом за окисненням р-фенілендіаміну, за участі церулоплазміну [152].

Вміст відновленого глутатіону визначали спектрофотометричним методом у реакції з 5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойною) кислотою [153].

2.5. Статистичні дослідження

Дані представлені у вигляді медіани (Me) і квартильного розподілу Q25 % – Q75 % (Me[Q1-Q3] у гістологічних дослідженнях) і середнього значення (M) з похибкою стандартного відхилення (m) ($M \pm m$ у біохімічних дослідженнях). Статистичну обробку даних проведено за допомогою програмного забезпечення Origin Lab версії 8.0. Нормальність розподілу вибірок даних проводили за критерієм Колмогорова-Смирнова. Міжгрупова різниця у вибірках даних оцінена непараметричним тестом Крускала-Уолліса та U-критерієм Манна-Уїтні.

2.6. Біоетичні аспекти виконання роботи

Дослідження проводилися згідно рішення Комісії з питань біоетики ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» протокол № 5 від 11.11.2018 р. Усі процедури для лабораторних тварин проводилися відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та Директиви 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010) [154].

РОЗДІЛ 3

ПОРУШЕННЯ СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ КОЛІННОГО СУГЛОБА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ОСТЕОАРТРОЗУ

3.1. Результати дослідження капсули колінного суглоба

Через 1,5 і 2,5 місяці було досліджено стан колінного суглоба. При макроскопічному дослідженні колінний суглоб пошкодженої кінцівки характеризувався декількома основними проявами структурних змін. Встановлено збільшення обсягу оточуючих тканин, які структурно формують капсулу суглоба та поєднуються із зв'язковим апаратом м'язів кінцівки. Цілісність суглобової сумки (капсули) не порушена, але товщина стінки збільшена та має ділянки розшарування. Колінна ділянка характеризувалася збільшенням щільності кровоносних судин, набряком тканин суглобової сумки, наявністю рубцевих змін навколо місця хірургічного доступу та термічного пошкодження (рис. 3.1).

Параартикулярні тканини були від блілого жовтого до червоного кольору, що пов'язано з розвитком місцевого запалення і посттравматичного ангіогенезу. Крайнім проявом цих змін було значне збільшення обсягу тканин капсули за рахунок потовщення, крововиливів і запальної інфільтрації.

Після розсічення скальпелем капсули суглоба, в інтактному суглобі (контралатеральної кінцівки) реєстрували непошкоджені суглобові поверхні стегнової і великогомілкової кістки, з цілісною хрестовидною та медіальною зв'язкою і менісками, а у пошкодженому суглобі (іпсилатеральної кінцівки) – різного ступеня деформації великогомілкової та візуально не зміненої стегнової кісток. Між суглобовими поверхнями у всіх дослідних зразках виявлено меніск, форма якого суттєво варіювала між зразками. Зовнішній контур щільно і структурно був поєднаний з суглобовими поверхнями, а внутрішній – мав фрагментарні пошкодження, зменшення площі та був оточений желеподібним вмістом.

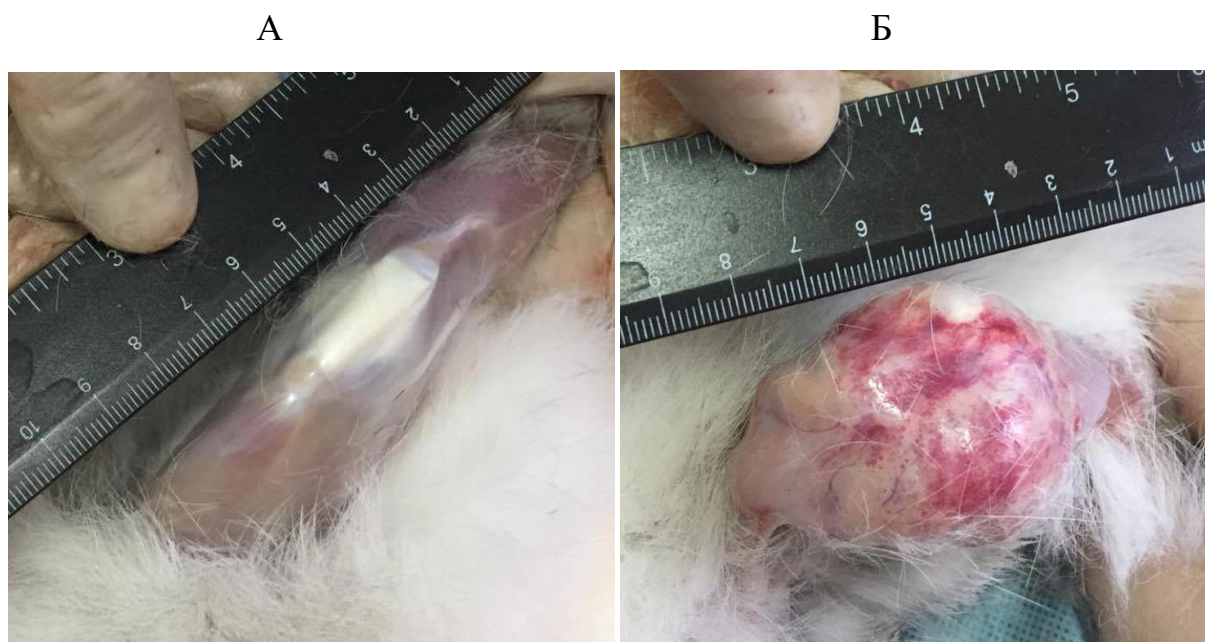


Рис. 3.1. Стан колінного суглоба через 1,5 і 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу. А – неушкоджена кінцівка, інтактний суглоб і його зв'язковий апарат; Б – ушкоджена кінцівка, різке збільшення обсягу тканини капсули, запалення. Нативний препарат.

Фрагменти капсули колінного суглоба було відібрано для гістологічного дослідження. При мікроскопічному вивченні усіх дослідних зразків виявлено структурно-функціональні шари капсули – зовнішній фіброзний і внутрішній синовіальний. Аналогічна пошарова будова капсули характерна для інтактної капсули. Відмічено значну варіабельність структурних порушень капсули та відмінність між термінами спостереження 1,5 і 2,5 місяці. У зразках капсули, відібраних через 1,5 місяці після операції, загальноморфологічна цілісність капсули була збережена. Зовнішній фіброзний шар капсули мав більшу щільність, порівняно з внутрішнім (останній формує межу між фіброзним шаром і синовіальним). Виявлено домінування структурних змін у внутрішніх шарах капсули. На структурному рівні це полягало у розшаруванні структурних компонентів капсули, дезорганізації пучків колагену, значним збільшенням інтерстиційного (оптично прозорого) простору (рис. 3.2). Ці зміни є

результатом деструктивних змін у тканинах капсули колінного суглоба, що можна розглядати як пошкодження, яке є наслідком нестабільності суглоба та порушення його біомеханічних властивостей.

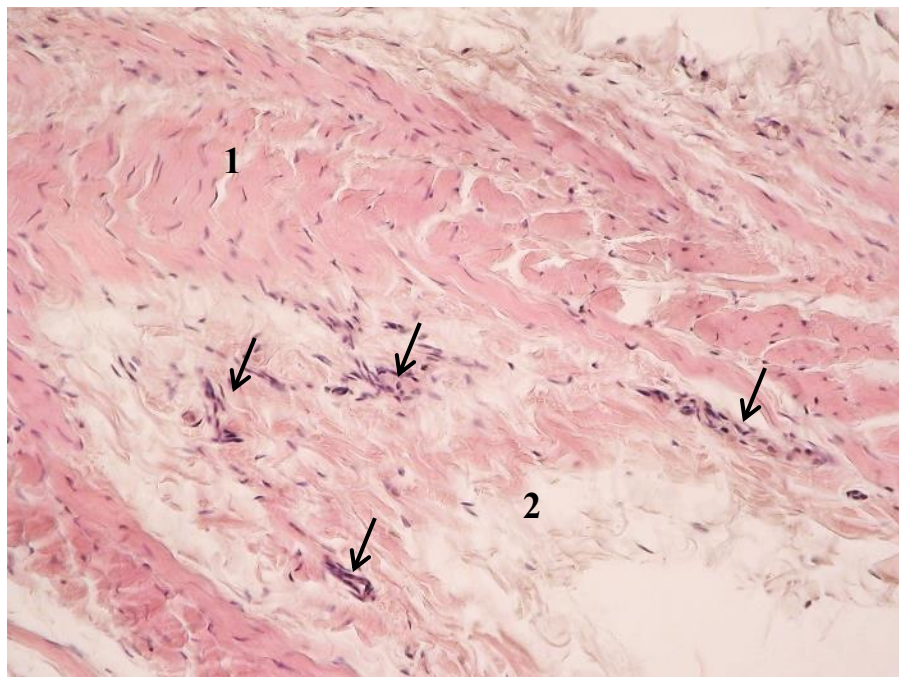


Рис. 3.2. Фрагмент капсули колінного суглоба після моделювання артрозу. Тяжі колагенових волокон по внутрішньому контуру капсули і дезорганізація колагену з внутрішньої поверхні капсули, мікросудини у внутрішньому шарі. 1 – зовнішній шар; 2 – внутрішній шар; ← мікросудини. Термін спостереження 1,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

Зовнішній шар капсули – фіброзний – представлений щільною волокнистою сполучною тканиною, структурні елементи якого охоплювали суглоб по всьому зовнішньому контуру і переходили у periost. Структурні зміни фіброзного шару капсули полягали у розшаруванні колагенових пучків, появі лакун з інтерстиційною желатиноподібною масою і зміні кровоносних судин. Структурні зміни судин капсули були неоднорідними і залежали від їх топографії у стінці капсули (ангіоархітектоніки капсули). В окремих артеріях

фіброзного шару встановлено зменшення просвіту за рахунок збільшення товщини інтими, появи фіброblastів у субендотеліальній зоні судини (рис. 3.3).

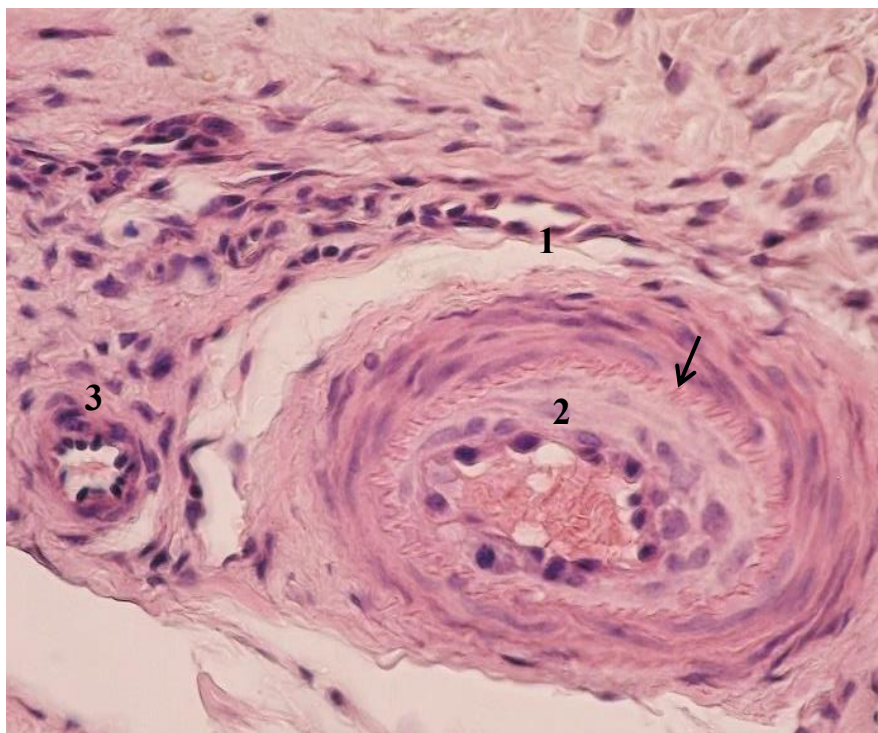


Рис. 3.3. Структурні зміни капсули колінного суглоба. Порушена щільність колагенових волокон капсули, інфільтрація лейкоцитів через судини капсули, збільшення товщини інтими артерії. 1 – м'язова оболонка артерії; 2 – просвіт артерії; 3 – просвіт артеріоли; ← поява шару клітин під інтимою артерії. Термін спостереження 1,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

На противагу цьому вени і оточуюча сполучна тканина містили значну кількість лейкоцитів (нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів), що вказує на їх інфільтрацію у стінку капсули і є морфологічною ознакою запалення (рис. 3.4).

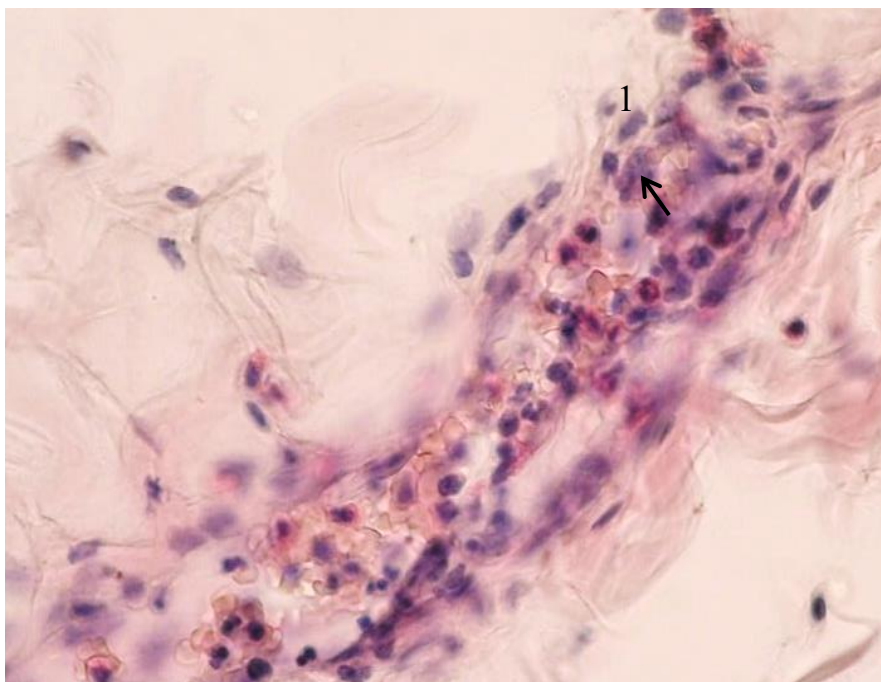


Рис. 3.4. Інфільтрація лейкоцитів у капсулі колінного суглоба. 1 – лейкоцити у вені: нейтрофіли і еозинофіли (←). Термін спостереження 1,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

Часто інфільтративні зміни навколо дрібних судин реєстрували у внутрішніх шарах капсули, особливо у синовіальній оболонці капсули (рис. 3.5).

Внутрішній шар капсули – синовіальна оболонка – вистилала синовіальну порожнину за виключенням меніска і суглобових поверхонь. Синовіальна мембрана (оболонка) містила ворсинки (відростки) (рис. 3.6).

У синовіальній оболонці та її ворсинках мікросудини різко кровонаповнені і стазовані, а в деяких зразках ворсинки мають загиблі клітини (синовіоцити), фрагментарно позбавлені клітин. Редукції синовіоцитів і в цілому ворсинок є проявом дистрофічних процесів у синовіальній оболонці капсули суглоба при розвитку остеоартрозу.

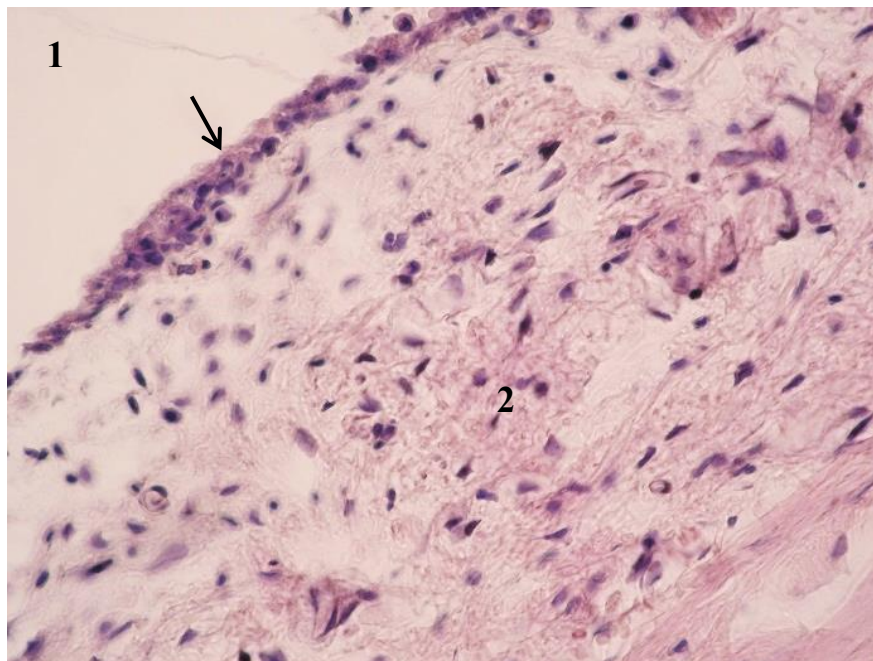


Рис. 3.5. Структурні зміни капсули колінного суглоба при моделюванні артрозу. набряк і дезорганізація внутрішнього шару капсули. 1 – просвіт капсули суглоба; 2 – внутрішній шар з дезорганізацією колагенових волокон; ← клітини синовіальної мембрани. Термін спостереження - 1,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

Тобто, через 1,5 місяці після моделювання остеоартрозу у суглобі розвинулися деструктивні зміни тканин капсули, які переважно домінували у внутрішньому її шарі, тобто синовіальній оболонці. Структурні порушення полягали у дистрофічних змінах клітин і порушенні мікроциркуляції у системі судин гемоциркуляторного русла (кровонаповнення, стаз мікросудин). Деструктивні зміни ворсинок позначились у втраті структурної цілісності синовіальної оболонки і фрагментарній втраті клітинної вистилки оболонки.

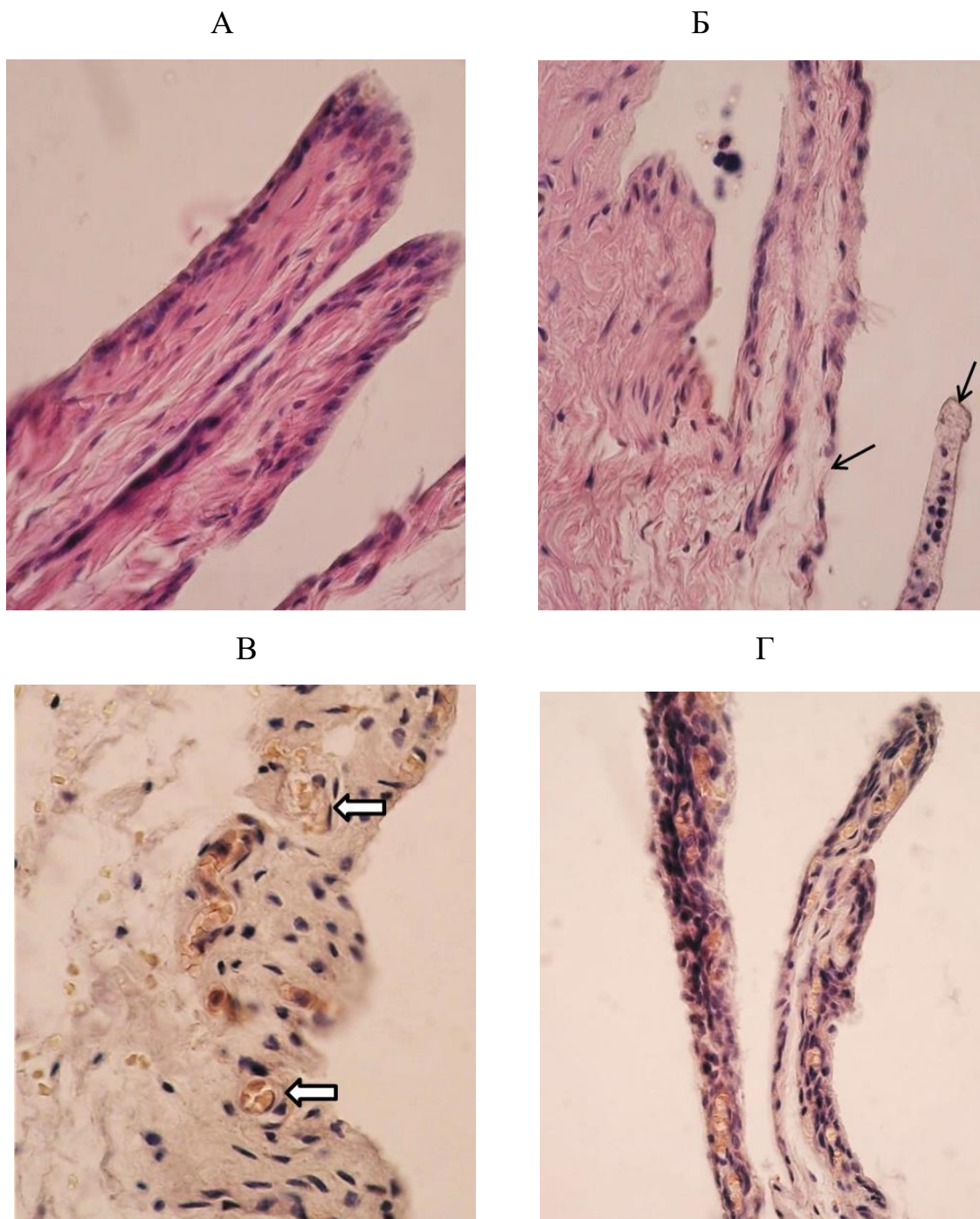


Рис. 3.6. Структурні зміни синовіальної оболонки капсули колінного суглоба. Різке кровонаповнення і стаз мікросудин синовіальної мембрани. А – інтактні ворсинки; Б – редукція синовіоцитів; В – кровонаповнення судин синовіальної мембрани; Г – кровонаповнення судин синовіальних ворсинок; ← – пошкодження і редукція клітин у ворсинках синовіальної мембрани; ⚡ – стазовані мікросудини. Термін спостереження 1,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

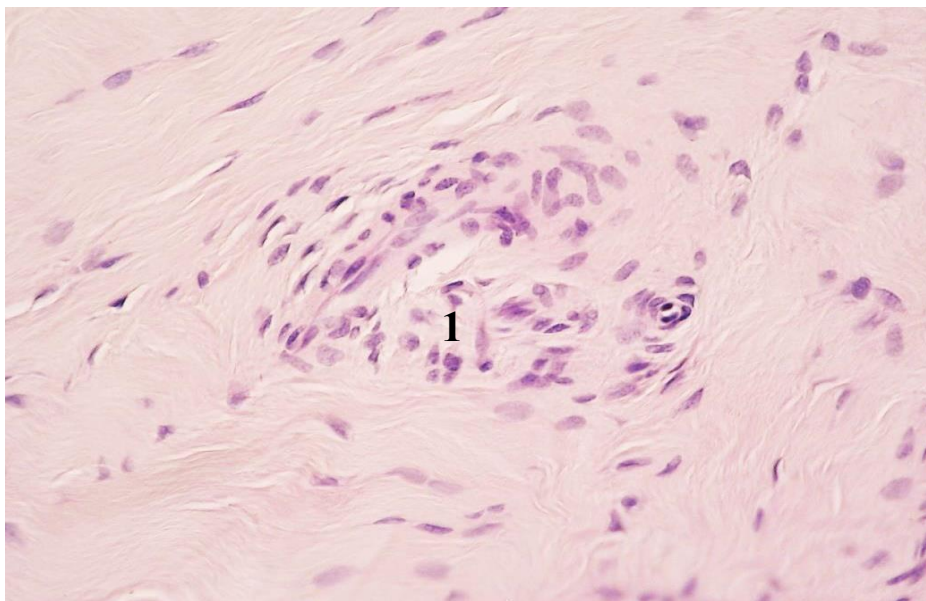
Під синовіальною оболонкою зміни полягали у дезорганізації шарів колагену, кровонаповненні дрібних артерій, вен та інфільтрації лейкоцитів навколо судин. Виявлені зміни вказують на розвиток кількох взаємопов'язаних порушень – деструкції регіональної мікроциркуляції, розвиток запалення і, як наслідок, дистрофічні зміни капсули суглоба.

Для того, щоб дослідити динаміку розвитку структурних змін колінного суглоба, було відібрано для гістологічного дослідження зразки дослідних тварин через 2,5 місяці після операції. У віддалений термін спостереження, було встановлено побічні структурні зміни капсули суглоба, ознаки прогресування пошкодження та деструкції ворсинок синовіальної мембрани, а також появу фокальних вогнищ гіперплазії фібробластів, що оцінено як прояв ініціації фіброзних змін стінки капсули (рис. 3.7). Як і у тварин, які належали до першої групи, також реєстрували дезорганізацію шарів колагенових волокон у фіброзному шарі капсули, кровонаповнення судин, інфільтрацію лейкоцитів, появу значної кількості оптичнопрозорого інтерстиційного простору під синовіальною мембраною. Ці зміни вказують на прогресуючі пошкодження позаклітинного матриксу у шарах капсули суглоба.

Досліджені структурні зміни капсули колінного суглоба було проаналізовано та трансформовано у бали для кількісного і статистичного вимірювань. У таблиці 3.1 наведено результати статистичної оцінки за методом McIlwraith C.W. (2010) [155].

Метод дозволив морфологічні зміни перевести у кількісний вимір і визначити ступінь пошкодження капсули. Зроблено висновок, що найбільш частими, значущими і вираженими змінами були: запальний процес, набряк і деструкція інтими синовіальної вистилки, в меншій мірі - фібробластична реакція та проліферація. Статистично значущої різниці між термінами спостереження не встановлено, але відмічено тенденцію до збільшення васкуляризації (ангіогенезу), набряку і фіброзу на 2,5 місяці, порівняно з 1,5-місячним терміном.

А



Б

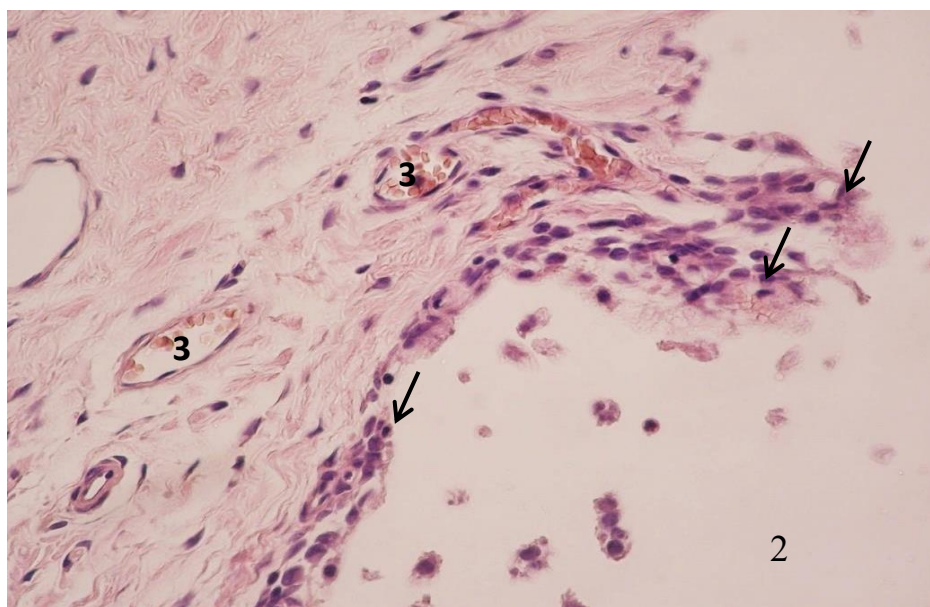


Рис. 3.7. Структурні зміни синовіальної оболонки капсули колінного суглоба (А). Різке кровонаповнення і стаз мікросудин синовіальної мембрани, редукція клітин у ворсинках (Б). 1 – ділянка гіперплазії фібробластів капсули; 2 – просвіт капсули; 3 – кровонаповнення судин синовіальної мембрани; ← деструктивні зміни ворсинок. Термін спостереження - 2,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

Продовження табл. 3.1

Показник	Бал	Контроль				Артроз-1,5 місяці				Артроз-2,5 місяці				
Субінтимальний набряк														
Немає	0	0	0	0										
Легкий набряк	1					1								
Помірний набряк у межах 25% розділу	2				2		2	2	2	2				
Помірний набряк в межах 25-50 % розділу	3												3	
Виражений набряк у більш ніж 50 % розділу	4										4	4	4	
Субінтимальний фіброз														
Норма	0	0	0	0	0									
Незначне збільшення фіброзу всередині секції	1					1	1	1						
Помірний фіброз у 25 % зразка	2									2				
Помірний фіброз у 25-50 % зразка	3											3	3	
Виражений фіброз у понад 50 % зразка	4								4		4		4	
Загальна кількість балів		0	0	0	4	7	10	9	7	8	8	14	11	14
Me[Q1-Q3]		0			7[5-9]				10[8-13]					

Таким чином, в залежності від терміну розвитку та прогресування патологічного процесу, спостерігається прогресування патогістологічної картини остеоартрозу. При цьому ці прогресуючі зміни стосуються не лише суглобового хряща, але й менісків, капсули суглоба, кровопостачання тканин суглоба і, як зазначалось вище, спостерігаються суттєві структурно-функціональні порушення, які візуалізуються в області субхондральної кістки колінного суглоба.

3.2. Результати дослідження суглобових менісків

При розсіченні скальпелем капсули колінного суглоба, меніски між суглобовими поверхнями стегнової і великогомілкової кістки були виявлені у всіх досліджених суглобах кролів через 1,5 і 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу. На макроскопічному рівні верхня, нижня і латеральна поверхня менісків були визначені, а їх контур структурно збережений. Виключенням була медіальна поверхня, а саме: відмічено фрагментарне пошкодження після моделювання патології (рис. 3.8).

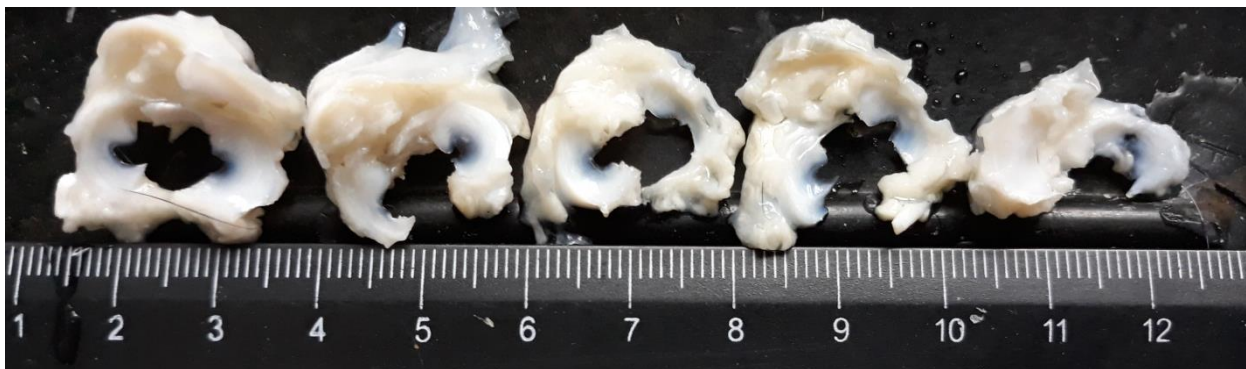
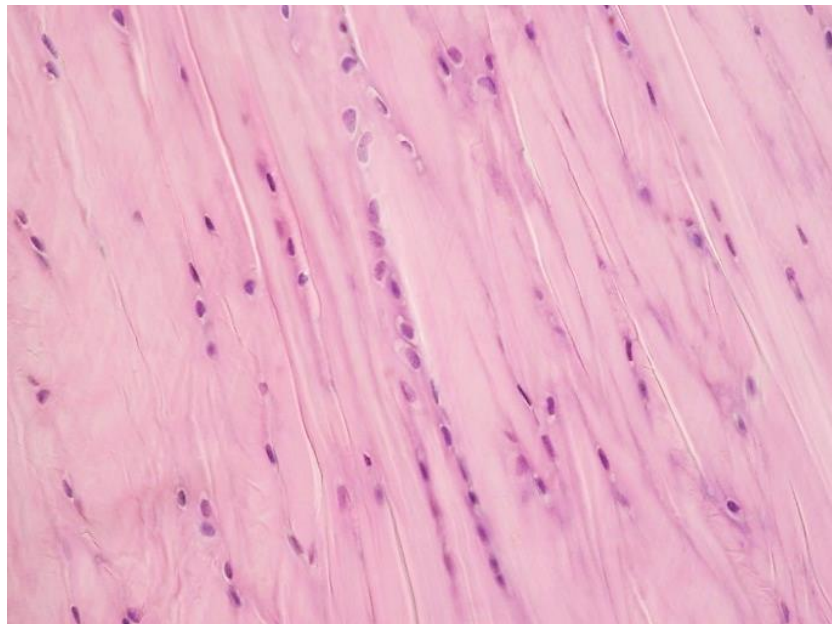


Рис. 3.8. Різний ступінь пошкодження меніска колінного суглоба дослідної групи тварин. Термін спостереження 2,5 місяці. Макропрепарат.

За результатами гістологічного дослідження будова меніска залишалась відносно однорідною, межі між верхньою, середньою і нижньою поверхнями нечіткі. Інтактний меніск представлений хрящовою тканиною, хондромукоїдом і хондроцитами. Останні локалізовані, головним чином, хаотично. За морфологією структура меніска подібна до гіалінового хряща, як і суглобові поверхні, лише у латеральній поверхні хондроцити формують веретиноподібні структури, між якими відмічено пучки колагену. Характерною ранньою морфологічною ознакою пошкодження меніска, при моделюванні остеоартрозу, був набряк клітинних лакун, а пізньою – загибель хондроцитів і редукція

щільності ізогенних груп у об'ємі хондромукоїду, поява порожніх (безклітинних) лакун (рис. 3.9). Через 2,5 місяці після операції

А



Б

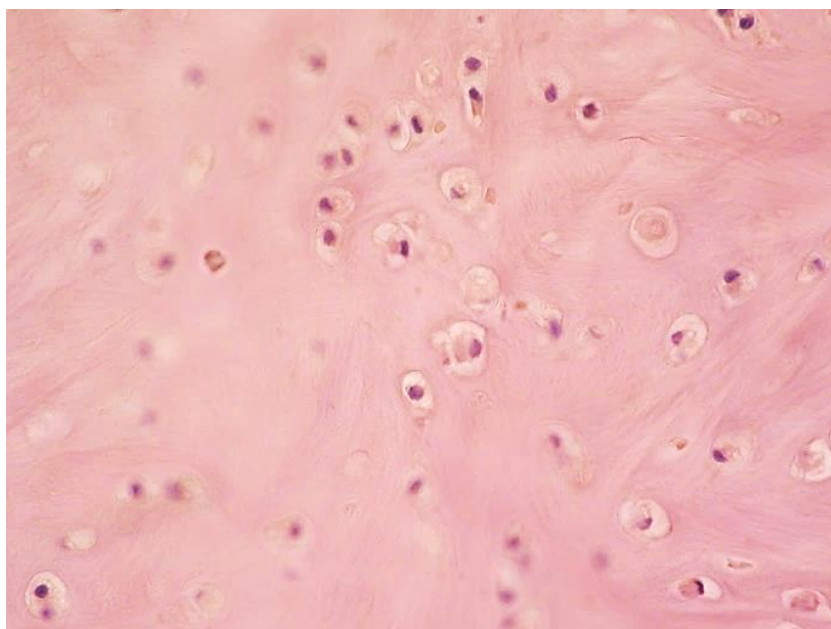
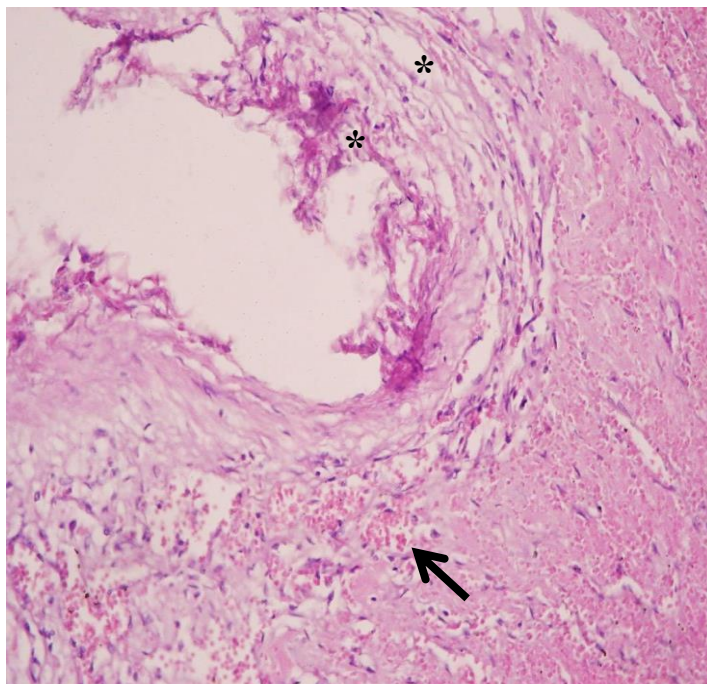


Рис. 3.9. Структурні зміни мениска колінного суглоба. А – інтактний мениск; Б – загибель хондроцитів, збільшення об'єму лакун. Термін спостереження 1,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

А



Б

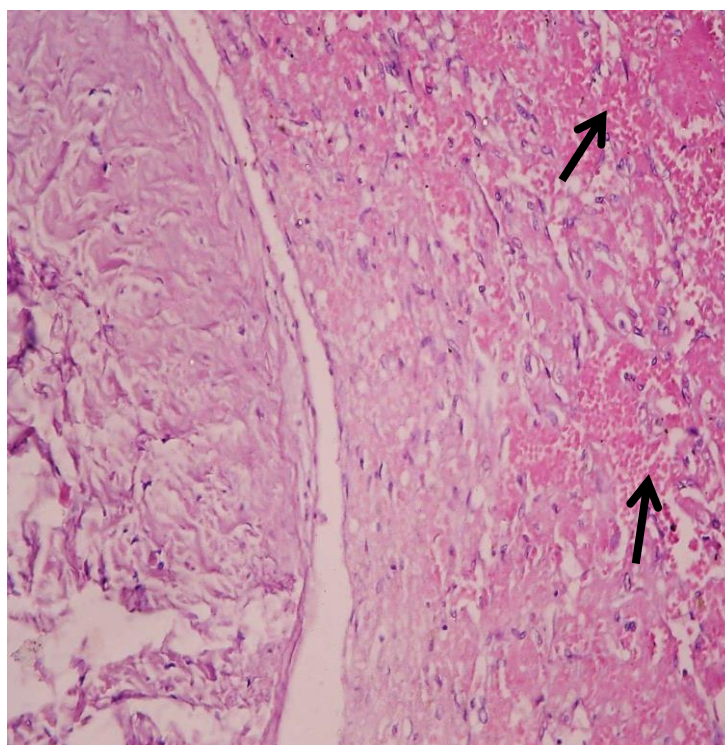


Рис. 3.10. Пошкодження сполучної тканини меніска колінного суглоба при остеоартрозі (А, Б). * – деструктивні зміни; ← геморагічна пенетрація. Термін спостереження 2,5 місяці. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

виражені структурні порушення, додатково виявлені у сполучній тканині, яка поєднує тіло меніска з капсулою і епіфізом великогомілкової кістки. Реєстрували деструктивні процеси з геморагічною пенетрацією тканини меніска форменими елементами крові, що додатково підтверджує процеси некрозу, в тому числі ангіонекрозу, та прогресуючий характер розвитку остеоартрозу.

Таким чином, на основі результатів експериментального дослідження, зроблено висновок про участь судинного чинника у розвитку остеоартрозу колінного суглоба. Запропонована модель остеоартрозу дозволила отримати патологію, яка максимально наближена до патогенезу захворювання.

3.3. Результати дослідження структурних змін суглобової поверхні колінного суглоба

Через 1,5 і 2,5 місяці після операції було досліджено стан суглобової поверхні колінного суглоба тварин іпсілатеральної (дослідної) та контралатеральної (неушкодженої) кінцівки. На рисунку 3.11 показано результати макроскопії колінного суглоба контрольної і пошкодженої кінцівки. Виявлено різного рівня деструктивні зміни суглобової поверхні. Хрящова основа епіфізарної поверхні була зменшена у товщині, відмічено ділянки повної деструкції і «оголення» кістки (рис. 3.11).

Латеральні ділянки епіфізарної поверхні на макроскопічному рівні залишались не зміненими. Латеральний меніск між суглобовими поверхнями також візуально був не змінений, що дозволило його відділити від епіфізарної поверхні для гістологічного дослідження. У деяких зразках у суглобовій порожнині реєстрували желеподібний вміст і запальний інфільтрат.

На рисунках 3.12 і 3.13 показано результати гістологічного дослідження латеральної поверхні епіфіза великогомілкової кістки. Головними структурними проявами деструктивних змін були: зменшення

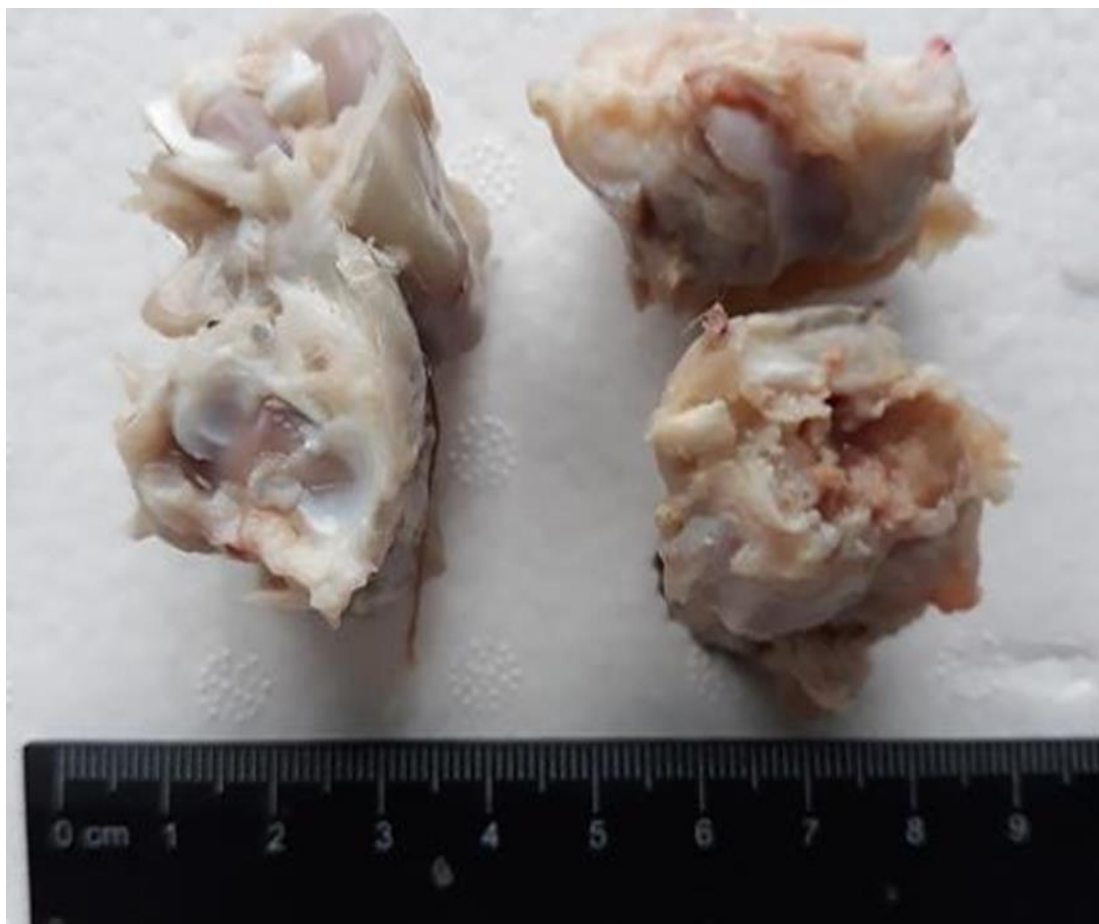
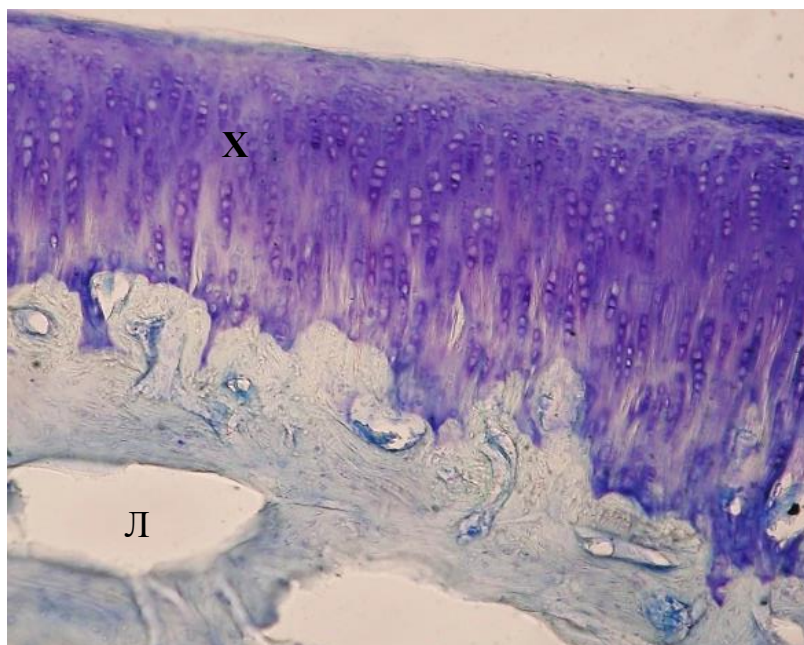


Рис. 3.11. Колінний суглоб дослідної групи тварин. Дегенеративні зміни голівки великогомілкової кістки. Термін спостереження 2,5 місяці. Макропрепарат.

товщини хрящової поверхні навколо післятравматичного дефекту, редукція клітинного складу, зміна контуру між гіаліновим хрящем і кістковою тканиною.

Між термінами спостереження відмічено прогресуюче зменшення клітинного складу хряща. Лакуни ізогенних груп (клони хондроцитів) часто були порожніми, хоча хрящовий матрикс (хондромукоїд) структурно був збереженим. Рівень профарбовування і метахромазії хрящового матриксу, при забарвленні толуїдиновим синім, був зменшеним, що вказує на зниження вмісту кислих глікозаміногліканів у хондромукоїді. Поверхневий шар гіалінового хряща часто деформований, безклітинний. Відмічено локальні

А



Б



Рис. 3.12. Гістологічне дослідження суглобової поверхні великогомілкової кістки дослідних тварин. Редукція хондроцитів у хрящі суглобової поверхні великогомілкової кістки. А – термін 1,5 місяці; Б – термін 2,5 місяці; Л – лакуни у кістковій тканині, Х – хрящ. Забарвлення толуїдиновим синім (А), по Шморлю (Б). Об. 40, ок. 10.

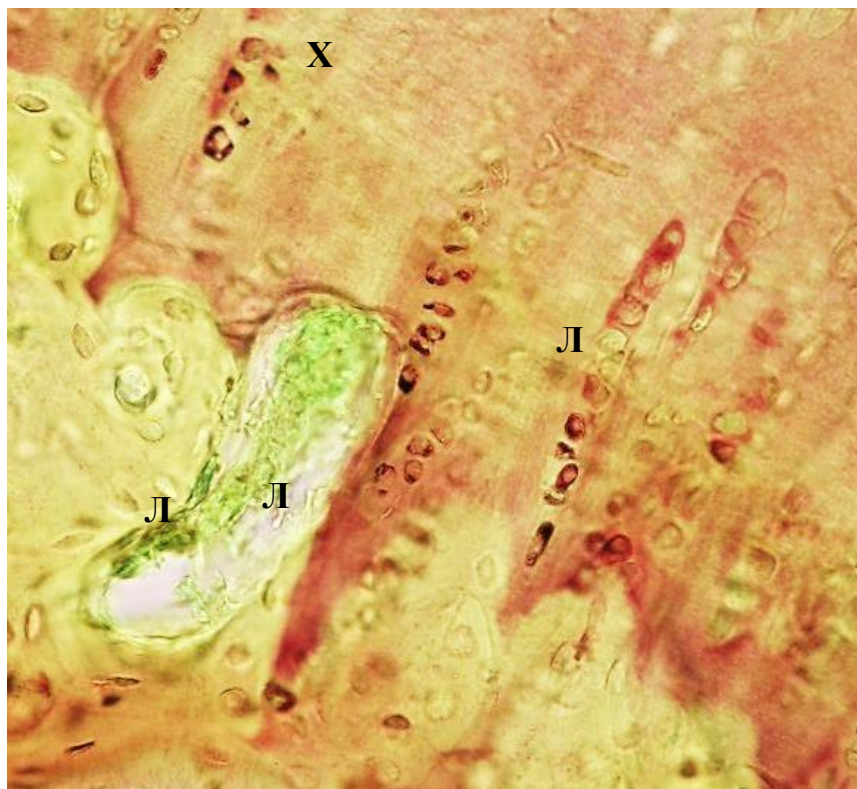


Рис. 3.13. Гістологічне дослідження суглобової поверхні великогомілкової кістки дослідних тварин. Л – лакуни у кістковій тканині; Х – хрящ. Зabarвлення по Шморлю. Термін спостереження 2,5 місяці. Об. 40, ок. 10.

деформації і заглиблення у товщу шару хряща. Це свідчить про деформаційні зміни латеральних поверхонь. У глибоких шарах хряща реєстрували появу лакун з кровоносними судинами. Судини з лакунами проникали у гіаліновий хрящ, змінюючи контур епіфізарної поверхні. Ці зміни було оцінено як прояв патологічного ремоделювання і деструктивних змін та ініціації остеоартрозу.

У таблиці 3.2 наведено результати кількісної оцінки структурних змін епіфіза великогомілкової кістки контралатеральної та іпсилатеральної кінцівки за шкалою J. Fitzgerald (2008). Виявлено тенденцію прогресуючої деструкції латеральних поверхонь гіалінового хряща, але статистично значущої різниці між термінами досліду - 1,5 і 2,5 місяців не було виявлено.

Кількісна оцінка деструктивних змін суглобової поверхні великогомілкової кістки

Показник	Бал	Контроль	Остеоартроз (1,5 місяці)				Остеоартроз (2,5 місяці)					
Клітинна морфологія												
Гіаліновий хрящ	4	4										
Переважає гіаліновий хрящ	3		3	3	3	3		3	3	3	3	0
Переважає фіброзно-хрящова	2						2					
Переважає нехрящова	1											
Лише нехрящова	0											
Забарвлення матриксу												
Нормальне	3	3	3									
Частково зменшене	2				2			2	2			
Суттєво зменшене	1			1		1	1			1	1	
Не забарвлюється	0											0
Регулярність поверхні												
Домінує – від 75 % до 100 %	3	3										
Помірна – від 50 % до 75 %	2		2	2	2	2		2	2	2	1	
Нерегулярна – від 25 % до 50 %	1						1					
Строго нерегулярна	0											0

Продовження табл. 3.2

Показник	Бал	Контроль	Остеоартроз (1,5 місяці)				Остеоартроз (2,5 місяці)					
Товщина хряща												
> 2/3	2	2	2			2		2				
1/2-2/3	1			1	1		1		1	1	1	
< 1/2	0											0
Інтеграція хрящових основ												
Обидва края інтегровані	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Один край інтегрований	1											
Жоден з країв не інтегровані	0											0
Загальна кількість балів		14	12	9	10	10	7	11	10	9	8	0
M[Q1-Q3]		14	10[8-11]				9[4-10,5]					

На основі результатів гістологічних досліджень зроблено висновок про те, що запропонована модель дозволяє відтворити остеоартроз колінного суглоба з чіткою локалізацією та обсягом ураження. Інвазія кровоносних судин у гіаліновий хрящ із супутньою дегенерацією і редукцією глибоких шарів хряща також є ранніми морфологічними проявами остеоартрозу. Зменшення рівня профарбовування хондромукоїду є раннім проявом структурних змін гіалінового хряща (у подальші терміни спостереження виявляли позитивне забарвлення тільки навколо збережених хондроцитів). Редукція хондроцитів внаслідок набряку і деструкції клітин, апоптозу хондроцитів є раннім проявом дегенеративних змін хряща. Прогресуючі зміни додатково характеризувались деструкцією і втратою поверхневих шарів епіфізарного хряща.

Втрата епіфізарного хряща і «оголення» кісткової тканини є остаточним (кінцевим) етапом розвитку остеоартрозу. На основі одержаних даних зроблено заключення, що перетин медіальної зв'язки викликає нестабільність та порушує біомеханіку колінного суглоба, а обмежене пошкодження гіалінового хряща додатково ініціює розвиток дегенеративних змін, які обмежено реєструються через 1,5 місяці і достовірно прогресують через 2,5 місяці спостереження.

Заклучення до розділу 3

За результатами гістологічного дослідження структурних утворень колінного суглоба дослідних тварин, у яких моделювали експериментальний артроз, зроблено кілька основних заключень. По-перше, запропонований спосіб відтворення пошкодження суглобової поверхні великогомілкової кістки викликав не лише фокальні дегенеративні зміни епіфізарного хряща, а і її прогресування по зовнішньому контуру зони ураження. Характер розвитку дегенеративних змін полягав у редукції клітинного складу хряща, що є прямим наслідком загибелі хондроцитів. При цьому відмічено виражену тенденцію до прогресування дегенеративних змін хряща, хоча товщина «матриці» хряща (хондромукоїду) не мала статистично значущої різниці між термінами спостереження. Це потребує розробки додаткового методу статистичної оцінки ступеня ураження суглобової поверхні та дослідження впливу протекторних засобів. Головним заключенням цього розділу є достовірне поглиблення рівня ушкодження, що полягало у пошкодженні трабекулярної будови епіфіза і епіфізарного кісткового мозку. По-друге, дегенеративні зміни не обмежувались лише епіфізом великогомілкової кістки. Меніск, який також побудований з хряща, теж зазнав пошкодження. Виявлені структурні зміни було оцінено як аналогічні тим, що зареєстровано у епіфізарному хрящі, але з меншим ступенем (лише набряк і загибель ізогенних груп хондроцитів). Такі зміни, вочевидь, почали розвиватися внаслідок зміненої біомеханіки колінного суглоба. По-третє, зміни у капсулі суглоба, спричинені механічним і термічним

пошкодженням, спричиняли розвиток набряку і розволокнення структурних компонентів капсули, дистрофічні зміни внутрішнього шару капсули, який реалізує синтез та обмін синовіальної рідини. Стаз і гіперемія кровоносних судин інтими і її дегенеративні зміни є структурним проявом зниженої перфузії, а фокальні лейкоцитарні інфільтрати підтверджують наявність запального процесу. Загальним висновком експериментального розділу роботи є патогенетична відповідність запропонованої моделі артрозу клінічній картині захворювання.

Також встановлено зміни субхондральної епіфізарної кістки та порушення стінки синовіальної оболонки. Якщо структурні основи пошкодження суглобової поверхні описано у багатьох публікаціях, то окремий інтерес мають результати дослідження суглобової капсули. Схожі структурні порушення хряща описано при введенні колагенази VII [70], натрієвої солі моноіодоцтової кислоти [72], дексаметазону [69], вітаміну А [71], створенні механічного дефекту та перетинанні хрестоподібної зв'язки [77, 78, 79, 80, 81]. Але увага зосереджена, головним чином, на суглобовій поверхні, а змінам капсули і, головне, судинам не приділяється достатньої уваги. Як відомо, кісткова тканина характеризується високою васкуляризацією, особливо епіфізи кісток. Тому судинна патологія, на рівні кісток, позначається на метаболізмі епіфізарного хряща, оскільки суглобова поверхня позбавлена власних судин. Такою є нормальна гістофізіологія хрящової тканини і її трофіка реалізується з субепіфізарної кістки та суглобової сумки, синовіальної рідини. Тому порушення перфузії судин капсули позначається на метаболізмі всього суглобу. Це пояснюють тим, що зменшена перфузія спричиняє застійні явища у судинах капсули, що супроводжується збільшенням проникності стінки судин, виходу плазми та розвитку інтерстиційного набряку. Ознаки таких змін виявлено у власних дослідженнях – збільшення інтерстиційної рідини, розшарування капсули, стаз судин капсули і загибель синовіоцитів, які формують ворсинки синовіальної мембрани. Ці зміни оцінено як наслідок ішемічного пошкодження. Ішемія призводить до втрати життєздатності клітин суглобової стінки,

хондроцитів менісків та суглобових поверхонь, субхондральної кістки. Деформаційне пошкодження поверхні великогомілкової кістки спричинило деструктивні зміни і на рівні кістки, які полягали у формуванні порожніх лакун, позбавлених кісткового мозку, що є ознакою резорбції кістки. Очевидно, що зміни на рівні капсули, меніска і кістки є стадійними і мають пряму залежність з ступенем втрати перфузії регіонарних судин. Відповідно з цим, зниження перфузії і прогресуюча ішемія визначає характер перебігу дистрофічних змін хряща суглоба. Результати власних досліджень дозволили зробити заключення про те, що життєздатність епіфізарного хряща суглоба залежить від адекватного кровопостачання оточуючих судин, і судинний чинник впливає на патогенез остеоартрозу.

Список опублікованих праць до розділу 3:

1. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Спосіб моделювання хронічного остеоартрозу колінного суглоба у кролів. Патент України на корисну модель № 130791, Опубл. 26.12.2018, бюл. № 24. Доступний через: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=253962>.

2. Ткачук ПВ, Страфун СС, Кучменко ОБ, Савосько СІ, Гайович ІВ, Макаренко ОМ, Мхітарян ЛС, Дроботько ТФ. Оцінка впливу тромбоцитарної плазми на біохімічні показники крові в експериментальній моделі остеоартрозу колінного суглоба. Травма. 2019;20(4): 39-45. *(Особистий внесок – вивчення літератури за темою, проведення експериментів на лабораторних тваринах, підготовка статті до друку).*

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАРНОЇ ПЛАЗМИ, КЛІТИН АСПІРАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ НА РОЗВИТОК СТРУКТУРНИХ ЗМІН КОЛІННОГО СУГЛОБА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ОСТЕОАРТРОЗУ

4.1. Результати досліджень структурних змін капсули колінного суглоба після введення клітинних суспензій

Через 1 місяць після введення у колінний суглоб ЗТП та клітинних аспіратів (тобто через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу) проведено комплексний аналіз структурних утворень колінного суглоба: капсули суглоба, менісків, епіфізарного хряща великогомілкової кістки, в тому числі зони субхондральної кісткової тканини. При макроскопічному дослідженні капсула пошкодженого колінного суглоба усіх дослідних тварин була візуально збільшеною, пружною і з новоутвореними судинами. Останнє оцінено як структурний прояв додаткової активації ангиогенезу та реваскуляризації пошкоджених тканин капсули суглоба. На розрізі капсули відмічено збільшення її товщини та зміну кольору, а у зразках із запаленням реєстрували вихід ексудативної рідини.

При гістологічному дослідженні вивчали структурні зміни капсули суглоба. Як вже було описано у пункті 4.1 капсула інтактного та пошкодженого суглобів на структурному рівні має два шари: внутрішній – синовіальний і зовнішній – фіброзний. В усіх дослідних зразках із застосованими клітинними суспензіями стінка капсули мала подібну організацію. Загальноморфологічна структура стінки капсули не відрізнялась між групами порівняння, тобто після введення ЗТП, аспіратів кісткового мозку та жирової тканини. Головним структурним елементом фіброзної оболонки була щільна сполучна тканина. В деяких ділянках виявлено розшарування колагенових пучків, інфільтрацію

лейкоцитів. На рівні фіброзної оболонки реєстрували окремі кровоносні судини (дрібні артерії і вени), судинна сітка була нерівномірною. Особливу увагу звернули на зміну синовіальної оболонки. Остання формує у просвіт суглобової порожнини ворсинки. Морфологія ворсинок представлена одним або декількома шарами епітеліальних клітин (синовіальною мембраною), під якими локалізуються дрібні мікросудини, що є регіональним мікроциркуляторним руслом, яке походить від судин більшого калібру капсули. Морфологія і стан ворсинок мала значну варіабельність, як у межах однієї групи, так і між групами порівняння. Тому достовірно стверджувати про існування міжгрупової різниці за морфологічним станом ворсинок не можна, проте відмічено їх більшу щільність через 2,5 місяці після введення ЗТП і клітин кісткового мозку та жирової тканини аспіратів. Описані зміни у різній мірі виявлено у всіх дослідних зразках іпсилатеральної кінцівки, їх оцінено як неспецифічні, що підтверджують системний розвиток структурних порушень колінного суглобу при розвитку остеоартрозу. В порівняльному аспекті були відмічені деякі особливості реорганізації синовіальної оболонки у групах порівняння і, у меншій мірі, фіброзного шару капсули.

У групі із введенням ЗТП виявлено наступні структурні зміни синовіальної оболонки. Реєстрували порушення цілісності мікросудин у сполучній тканині оболонки підсиновіального шару, геморагічну penetрацію оболонки, що є свідченням регіонального ангіонекрозу (рис. 4.1). Клітини синовіальної мембрани у цих ділянках мали морфологічні ознаки дистрофічних змін: апоптоз і каріопікноз, редукцію щільності клітин, втрату міжклітинних контактів з появою оптичнопрозорого міжклітинного простору, десквамацію клітин від суцільного шару синовіальної мембрани у просвіт порожнини капсули. Ці зміни є наслідком порушеної мікроциркуляції та ішемізації клітин синовіальної оболонки. Внаслідок цього відбувалась деформація частини ворсинок, дистрофічні зміни епітеліальної мембрани ворсинок, набряк сполучної тканини і редукція її основних клітин – фібробластів.

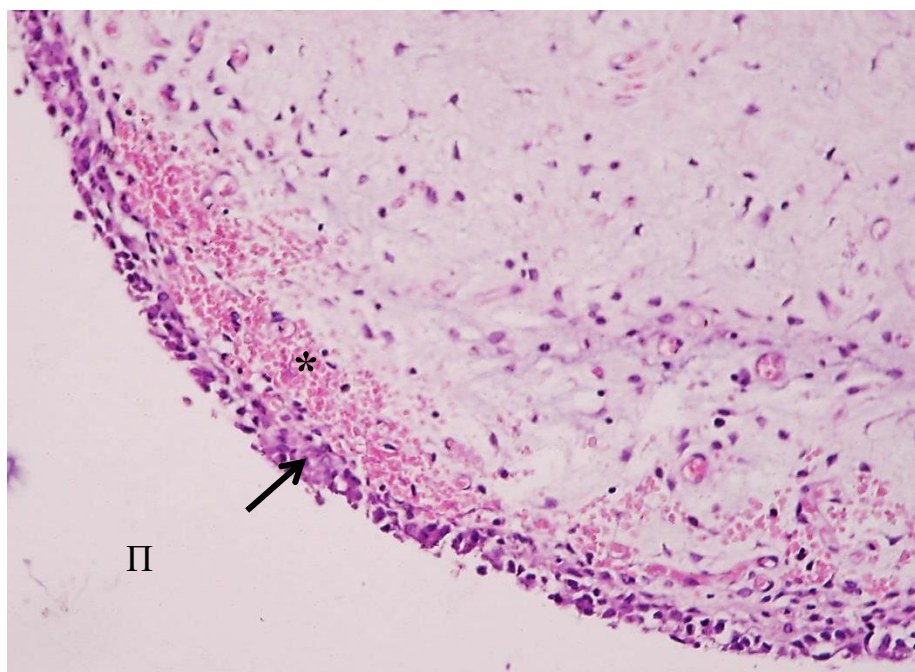


Рис. 4.1. Геморагічна penetрація підсиновіального шару і дистрофічні зміни клітин синовіальної мембрани капсули суглоба після моделювання остеоартрозу та введення ЗТП. П – просвіт капсули; * – крововилив. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У порівнянні з групою без введення ЗТП можна стверджувати про більшу кількість збережених ворсинок синовіальної оболонки та часткове збереження клітин синовіальної мембрани (рис. 4.2). Проте структурні зміни, які були виявлені у дослідній групі, вказують на виражене порушення регіональної мікроциркуляції, що позначилось на стані клітинних елементів синовіальної оболонки. При цьому, фіброзна оболонка залишалась достатньо збереженою, а локальне збільшення щільності мікросудин і фібробластів у підсиновіальній зоні оцінено як прояв захисної, підтримувальної дії ЗТП і репаративної реакції сполучної тканини капсули на механічне та коагуляційне пошкодження при моделюванні остеоартрозу.

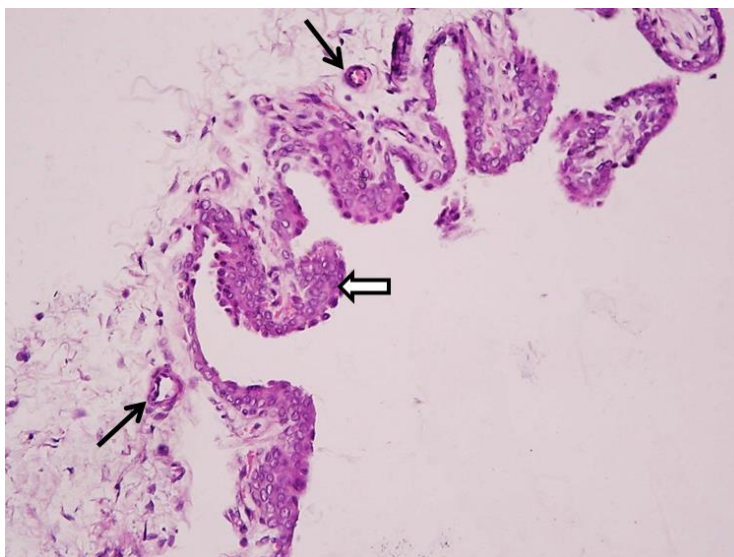


Рис. 4.2. Структурні зміни синовіальної оболонки капсули суглоба після моделювання остеоартрозу та введення ЗТП. Геморагічна penetрація підсиновіального шару, дистрофічні зміни клітин синовіальної мембрани. ← судини синовіальної мембрани; ⇐ збережені ворсинки. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У групі з введенням аспірату клітин кісткового мозку встановлено важливі морфофункціональні та репаративні зміни. Фіброзна оболонка капсули суглоба у значній мірі збережена, представлена сполучною тканиною із нерівномірною щільністю волокнистих структур (рис. 4.3).

Морфологічних ознак некрозу або запальної інфільтрації у фіброзному шарі досліджених зразків не виявлено, хоча навколо деяких судин відмічено дистрофічні зміни клітинних елементів оболонки (оцінено як редукції паравазальних фібробластів, каріопікноз клітин). Синовіальна мембрана мала значно кращий ступінь структурного збереження, порівняно з групою без введення клітинних аспіратів. Доказом цього були: більша щільність, довжина, розгалуженість і варіабельність морфології ворсинок синовіальної оболонки (рис. 4.4). У стромальних елементах ворсинок реєстрували окремі структурно збережені мікросудини (капіляри, венули, артеріоли). Поверхня ворсинок відносно щільно і майже по всьому контуру покрита епітеліальними клітинами

мембрани, хоча «прогалини» також було виявлено, що вказує на їх пошкодження.

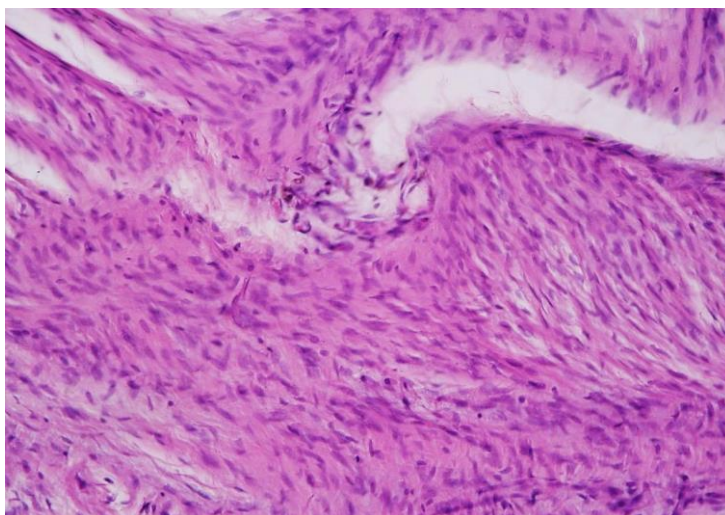


Рис. 4.3. Майже непорушена морфологія фіброзної капсули колінного суглоба після моделювання остеоартрозу та введення аспірату кісткового мозку. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

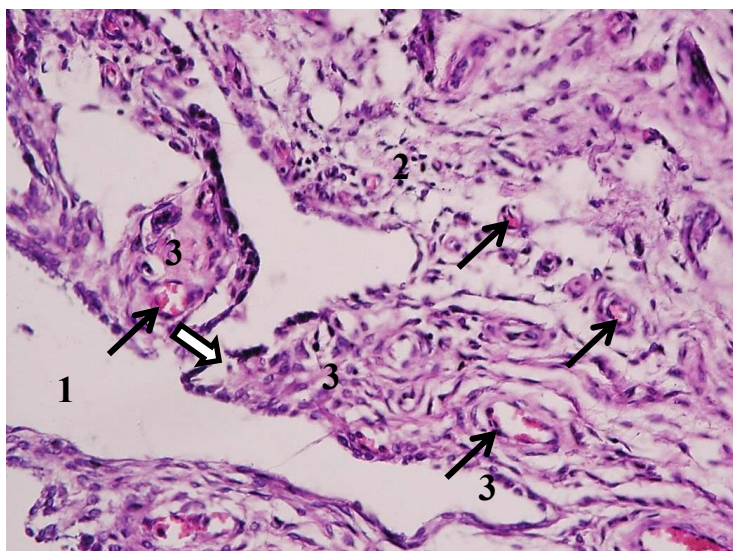


Рис. 4.4. Морфологія синовіальної оболонки колінного суглоба після моделювання остеоартрозу та введення аспірату кісткового мозку. Частково збережені ворсинки, мікросудини у підсиновіальній зоні. 1 – просвіт капсули; 2 – синовіальна оболонка; 3 – ворсинки; ← кровеносні мікросудини; ⇐ ділянки структурного пошкодження ворсинки. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

Реєстрували і структурні непошкоджені ділянки синовіальної оболонки із збереженими усіма структурними елементами. На межі синовіальної оболонки та менісків виявлено осередки морфогенезу ретикулярної тканини, яка утворилась після введення аспірату кісткового мозку (рис. 4.5). Її морфогенез характеризувався формуванням мікросудин та ретикулярної тканини, між якими реєстрували лімфоцити, поодинокі нейтрофіли. Появу у порожнині суглобу описаних клітинних утворень оцінено як доказ збереження клітин введеного аспірату, їх міграції та формування ретикулярної тканини із мікросудинами.

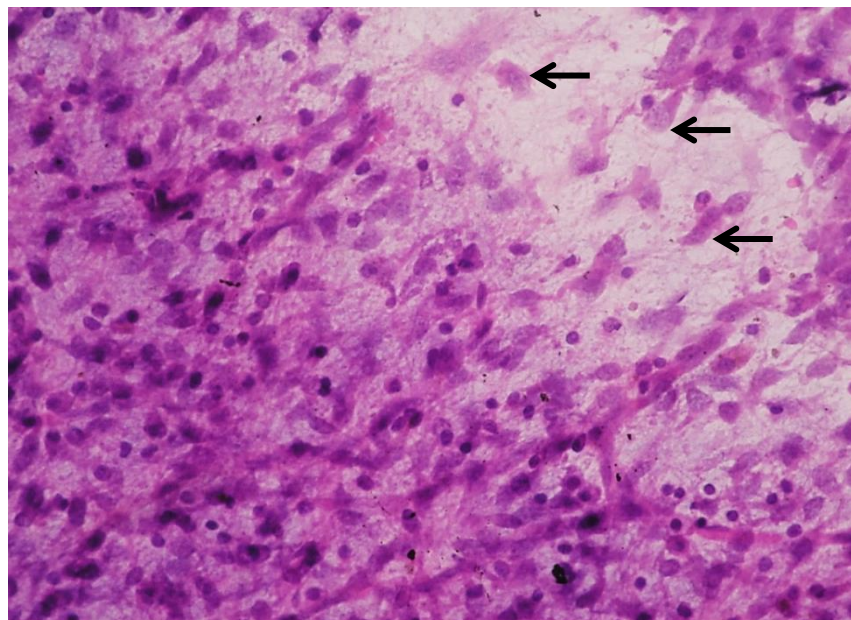


Рис. 4.5. Морфогенез ретикулярної тканини на межі синовіальної оболонки та меніска суглоба після моделювання остеоартрозу та введення аспірату кісткового мозку. ← ретикулярні клітин. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У групі з введенням аспірату жирової тканини встановлено значну варіабельність морфофункціональних змін капсули суглоба. В одному зразку реєстрували запальну інфільтрацію нейтрофілами, еозинофілами та макрофагами на рівні фіброзної капсули та синовіальної оболонки. Морфологія

фіброзної капсули, за таких умов, була порушена: зменшена щільність волокнистих структур, розволокнення колагенових пучків, ангіонекроз окремих судин і геморагічне просочення пошкодженої сполучної тканини капсули. В інших зразках структурна цілісність шарів капсули була більш збереженою, окремо відмічено фіброзну та синовіальну оболонки. Слід зазначити, що і у групах з тромбоцитарною плазмою, і аспіратом клітин кісткового мозку, було встановлено більшу щільність та довжину ворсинок синовіальної оболонки. Ворсинки містили стромальну сполучну тканину з поодинокими мікросудинами (головним чином гемокапіляри) та інфільтровані лейкоцити (лімфоцити, нейтрофіли, клітини моноцитарного ряду). Контур ворсинок по превалюючому периметру мав шар синовіоцитів, що є морфологічним проявом збереження синовіальної мембрани (рис. 4.6).

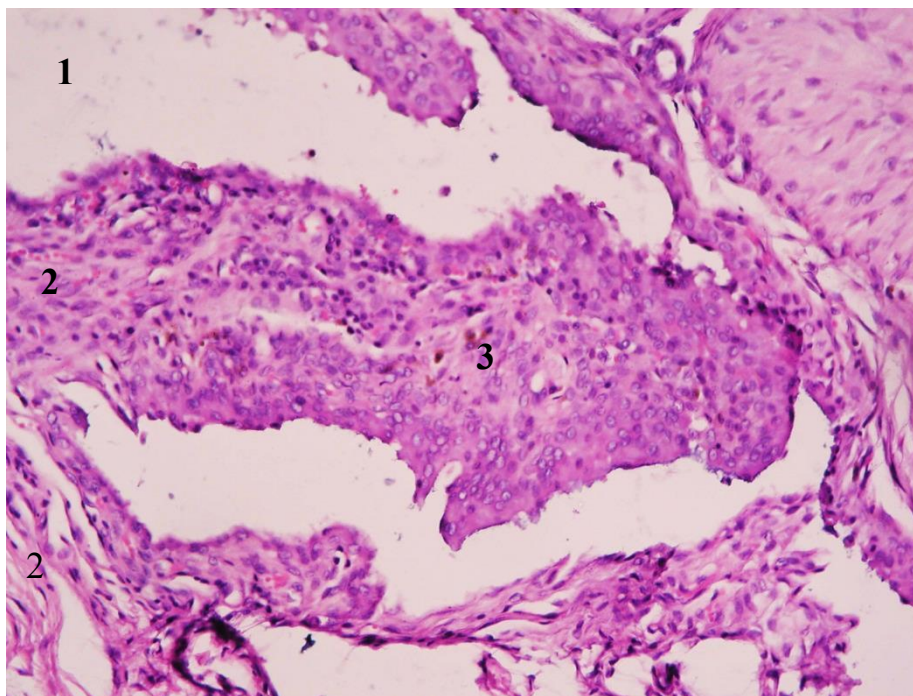


Рис. 4.6. Структурні зміни синовіальної оболонки капсули колінного суглобу через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату жирової тканини. Частково структурно збережена ворсинка. 1 – просвіт капсули; 2 – підсиновіальний шар; 3 – ворсинка; ← адипоцити. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

Проте часткове пошкодження ворсинок (фокальна редукція синовіоцитів, деформація ворсинки) також було відмічено.

У досліджених зразках на рівні синовіальної оболонки виявлено осередки жирової тканини, що є морфологічною відмінністю цієї дослідної групи (рис. 4.7). Локальне скупчення адипоцитів реєстрували у

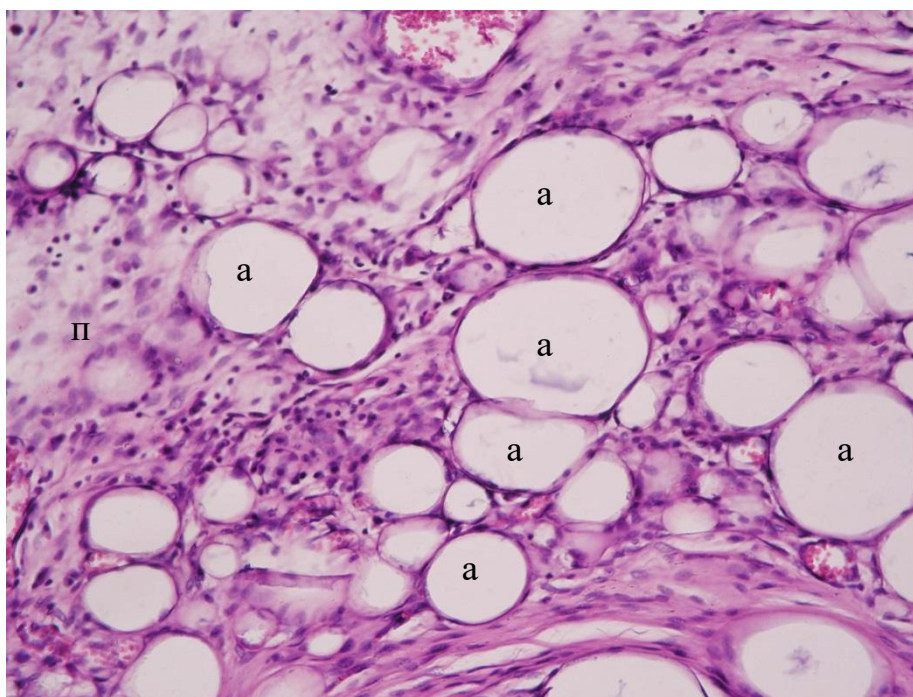


Рис. 4.7. Інтеграція адипоцитів у синовіальну оболонку капсули колінного суглоба через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату жирової тканини. п – підсиновіальний шар; а – адипоцити. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

підсиновіальному шарі та на межі з менісками суглоба, що є свідченням їх життєздатності після введення та наступної інтеграції до синовіальної оболонки. Поява адипоцитів та їх інтеграція у стромальні елементи синовіальної оболонки була специфічним проявом реакції введеної жирової тканини у колінний суглоб. Дія клітин жирової тканини полягала у їх інтеграції з синовіальною оболонкою, створенні додаткового внутрішнього жирового прошарку у стінці капсули. Серед осередків адипоцитів виявлено новоутворені

кровоносні судини, що також можна оцінити як активацію ангиогенезу у пошкодженій капсулі колінного суглоба після введення клітин жирової тканини.

На основі аналізу цих структурних змін зроблено заключення про те, що введення клітинних суспензій кісткового мозку та жирової тканини не викликало прогресуючого пошкодження синовіальної оболонки капсули колінного суглоба і навіть позитивно вплинуло на ступінь її збереження. Крім того, відбувається інтеграція клітин, які отримані з аспірату кісткового мозку та жирової тканини, з синовіальною оболонкою, що вказує як на їх збереження та життєздатність упродовж 30 діб після введення, так і на участь у репаративних процесах. Виявлена реорганізація капсули суглоба є структурним доказом їх дії та є перевагою, порівняно з введенням ЗТП. Виявлені зміни та ефекти введення клітинних суспензій було інтерпретовано у кількісний вимір, згідно методу McIlwraith C.W. (2010) (детальне пояснення методики у розділі 2) і у публікації [155]. У таблиці 4.1 наведено результати статистичного аналізу структурних змін капсули колінного суглоба у групах порівняння. Введення ЗТП і концентрату аспірату кісткового мозку пригнічувало запальні реакції сполучної тканини, проте при введенні усіх трьох груп препаратів спостерігалось зниження її розвитку та зменшення щільності.

Таким чином, на гістологічному рівні структурні порушення у капсулі колінного суглоба через 2,5 місяці, після моделювання остеоартрозу, полягають у розвитку дистрофічних змін, які головним чином зосереджені у синовіальній оболонці. Пошкодження структурних елементів ворсинок синовіальної оболонки є наслідком запального процесу та порушеної регіональної мікроциркуляції. Останнє пояснюється змінами перфузії судин зовнішньої фіброзної оболонки, яка була пошкоджена, шляхом термічної коагуляції. На основі гістологічних досліджень, зроблено висновок про важливість збереження та дослідження стану ворсинок синовіальної оболонки. У цьому контексті застосування клітинних технологій частково сприяло збереженню

синовіальної оболонки, та виявило деякі відмінності дії застосованих клітинних технологій.

Таблиця 4.1

Результати кількісної оцінки структурних змін капсули колінного суглобу на моделі остеоартрозу та впливу клітинних технологій на їх розвиток

Показник	Остеоартроз	Остеоартроз + ЗТП	Остеоартроз + концентрат аспірату кісткового мозку	Остеоартроз + аспірат жирової тканини
Інфільтрація лейкоцитів	3[0,5-3,5]	1[0,5-1]*	1[0,5-1,5]*	2[1,5-3,5]
Васкуля- ризація	3[2,5-3,5]	2[1-2]*	2[1,5-2,5]	2[2-2]*
Гіперплазія інтими	0[0-0,5]	0[0-0,5]	1[0,5-1]	1[1-1]
Субінтималь- ний набряк	4[2,5-4]	3[3-3]	2[1,5-2]	3[2,5-3,5]
Субінтималь- ний фіброз	3[2,5-4]	1[1-1,5]*	1[0,5-1]*	1[0,5-2]*
Me[Q1-Q3]	10[8-13]	7[6-7]*	7[5-7,5]*	9[7,5-12]

Примітка: * – достовірно по відношенню до групи з остеоартрозом ($p < 0,05$).

Менший ступінь пошкодження у капсулі колінного суглобу встановлено у групі з ЗТП та аспіратом клітин кісткового мозку. При цьому, між останніми

групами за непараметричним критерієм Крускала-Уоліса не виявлено різниці, хоча морфологічні відмінності тканинних реакцій були разючими. Так, після введення ЗТП частина ворсинок була збережена (у більшій мірі їх стромальні елементи), але виявлені осередки геморагічної пенетрації синовіальної оболонки, що є доказом порушеної мікроциркуляції, як у групі без введення ЗТП. З огляду на літературні дані можна припустити, що порушення цілісності мікросудин безпосередньо пов'язане з ішемічними змінами у пошкоджених тканинах [8].

У групі з аспіратом жирової тканини також виявлено менший ступінь фіброзних змін у синовіальній оболонці та післятравматичну реваскуляризацію. Геморагічне просочення пошкодженої сполучної тканини капсули було виявлено, як і у групі з ЗТП, так і без застосування клітинних технологій. Виявлено тенденцію до збереження щільності ворсинок у синовіальній оболонці. Клітини жирової тканини викликали додаткове формування жирового прошарку у внутрішньому шарі капсулі, активацію розвитку сполучної тканини і регенерації кровоносних судин. Така дія адипоцитів полягала у реорганізації структурних шарів капсули колінного суглобу. При цьому, додаткова інфільтрація лейкоцитів є тканинною реакцією на введення частково гомогенізованої жирової тканини та фізіологічною реакцією щодо утилізації продуктів некротизованих клітин.

Найбільш вагомим висновком у результаті досліджень капсули суглобу є морфологічні докази інтеграції клітин аспірату кісткового мозку з структурними елементами синовіальної оболонки та розвитку ретикулярної тканини. У групі з ЗТП цього не виявлено, що пояснюється коротким терміном життя тромбоцитів і їх неспроможністю до морфогенезу тканин. В останній дослідній групі аналогічно виявлено інтеграцію і формування жирової тканини, але супутні запальні реакції є негативним наслідком введення цього типу клітин. У групі з аспіратом кісткового мозку активується морфогенез ретикулярної тканини і супутній їй ангіогенез. Розвиток цих тканинних утворень не обмежується внутрішнім шаром капсули і поєднується з менісками

суглобів. У зв'язку з цим, актуальним було проведення додаткового дослідження структурних змін менісків колінного суглоба за умов інтеграції клітинних суспензій, з метою оцінки захисного впливу запропонованого підходу у збереженні хрящової тканини менісків при розвитку остеоартрозу.

4.2. Дослідження структурних змін менісків колінного суглоба

Меніски колінного суглоба було виділено у тварин із артрозом всіх дослідних груп. На макроскопічному рівні відмічено розвиток дегенеративних змін: зменшення товщини меніска, деформація або фрагментарна втрата менісків, порушення фіксації, набряк сполучної тканини на рівні передніх і задніх рогів меніска (рис. 4.8). При візуальному аналізі, суттєвих відмінностей між виділеними зразками дослідних груп не виявлено, тому подальші дослідження були проведені за допомогою гістологічних методів.

Аналіз гістопрепаратів пошкоджених менісків дозволив визначити основні структурні зміни, які були характерні для тварин усіх груп з остеоартрозом. Виявлено спільні неспецифічні структурні зміни та морфологічні прояви участі клітинних аспіратів у розвитку порушень. До неспецифічних порушень відносились: фрагментарне пошкодження хрящового матриксу меніска, його дистрофічні зміни, набряк сполучної тканини, яка оточує поверхні матриксу латерального і медіального меніска (тканини, які фіксують меніск до капсули суглоба). Верхня, нижня і латеральна поверхня тіла менісків у більшій мірі була структурно збереженою, тоді як пошкодження медіальної, пов'язані з маніпуляціями при моделюванні остеоартрозу.

У групі з введенням ЗТП тіло менісків все ще зберігало матрикс з гіалінового хряща. Топографія дистрофічних змін була нерегулярною: від структурно збереженого до розвитку часткової деструкції хондромукоїда. У непошкоджених ділянках зберігалась фізіологічна щільність хондроцитів, яка зростала до зовнішньої поверхні матриксу, тобто охрястя (рис. 4.9).

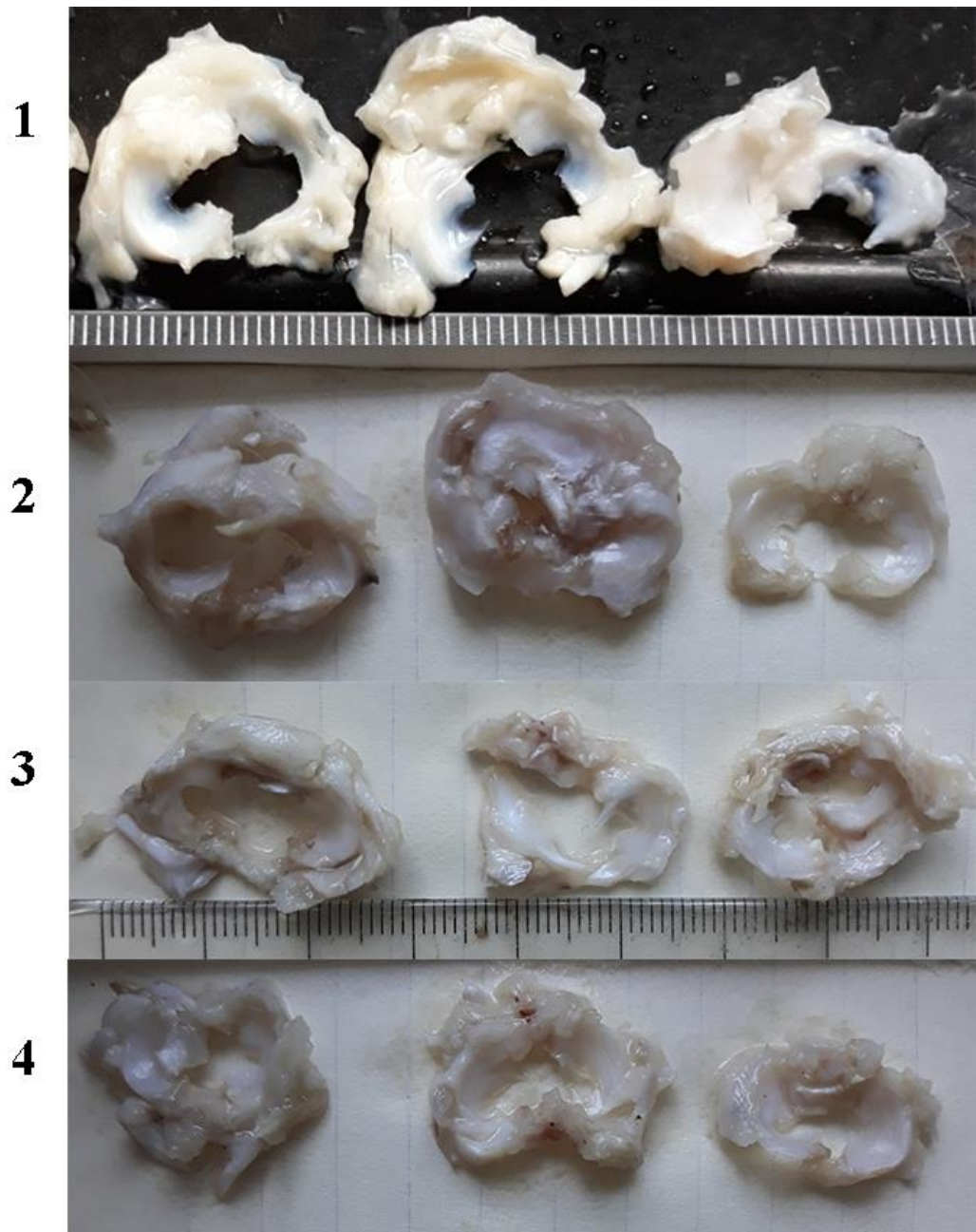


Рис. 4.8. Меніск колінного суглоба через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу. Макропрепарати. 1 – група з остеоартрозом; 2 – група з остеоартрозом і тромбоцитарною плазмою; 3 – група з остеоартрозом і введенням аспірату кісткового мозку; 4 – група з остеоартрозом і введенням аспірату жирової тканини.

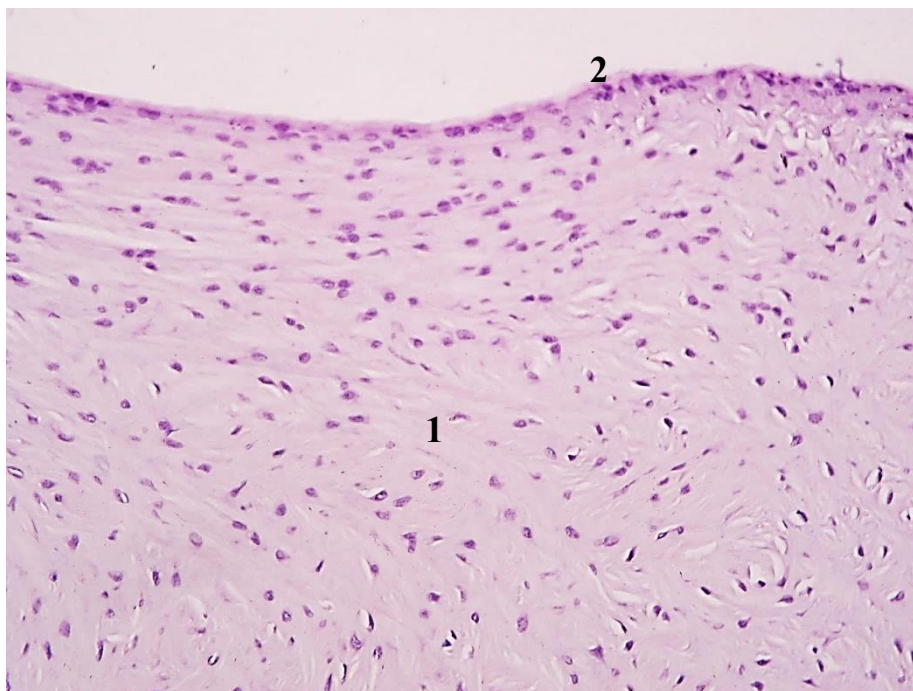


Рис. 4.9. Структурно непошкоджений меніск колінного суглоба після моделювання остеоартрозу та введення ЗТП. Матрикс меніска побудований з хрящової тканини, наявні хондроцити і охрястя. 1 – тіло меніска; 2 – охрястя. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

Локальні дистрофічні зміни охрястя також реєстрували (структурна цілісність нерегулярна, спостерігався каріопікноз клітин охрястя). У глибоких зонах матриксу меніска волокнисті структури, які представлені переважно колагеновими волокнами, мали порушену щільність, розволокнення і редукцію хондроцитів (рис. 4.10). Останнє пов'язане з загибеллю клітин (морфологічно реєстрували пікноз ядер хондроцитів).

Запальних інфільтрацій у матриксі менісків не виявлено, але в оточуючій сполучній тканині, що пов'язана з фіксацією меніска з суглобовими поверхнями і капсулою суглобу, виявлено поодинокі макрофаги і нейтрофіли, їх фокальні скупчення.

Збереження хондромукоїду у матриксі менісків було оцінено як прояв захисної дії ЗТП. У ділянках пошкодження структурні зміни полягали у дезорганізації (деструкції) хондромукоїду тіла меніска, появу значної

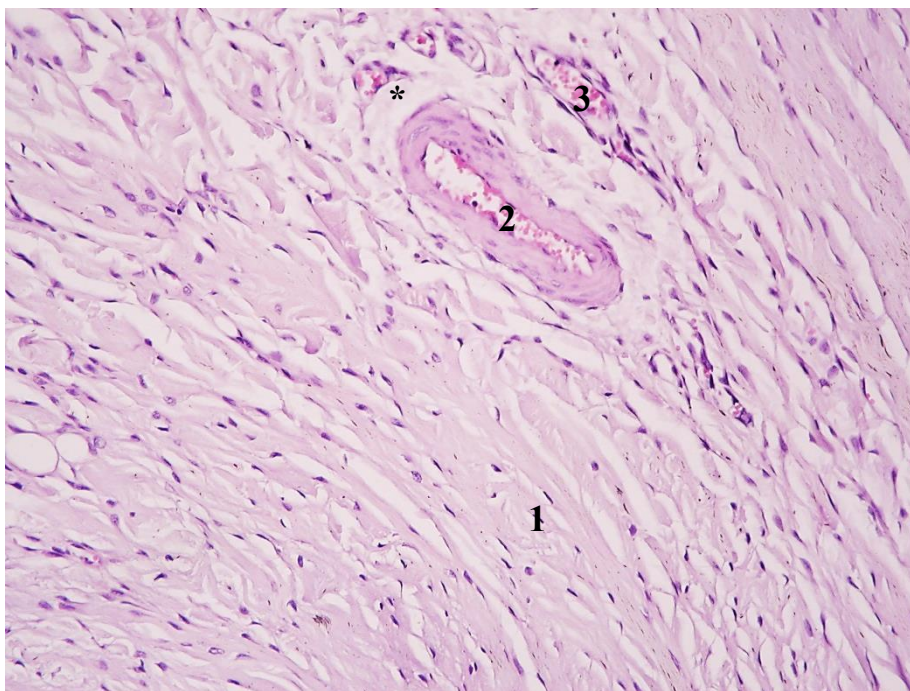


Рис. 4.10. Пошкодження меніска колінного суглоба після моделювання остеоартрозу та введення ЗТП. Структурні зміни хрящового матриксу меніска. 1 – тіло меніска; 2 – артерія; 3 – венула; * – деструкція матриксу. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

кількості показклітинного (оптичнопрозорого) простору. Наявність виявлених змін навколо кровоносних судин також вказує на патогенетичний зв'язок дистрофічних змін менісків з порушеною перфузією у системі кровоносних судин капсули колінного суглоба. Структурно збережені судини є опосередкованим проявом трофічної підтримки ЗТП, проте ця дія, очевидно, є обмеженою. Цим пояснюється розвиток структурних порушень у менісках і синовіальній оболонці капсули.

У групі з введенням аспірату клітин кісткового мозку також встановлено часткове збереження хрящового тіла меніска (рис. 4.11). Встановлено наявність збереженого охрястя і клітини зовнішньої зони хряща; у глибокій зоні, в превалюючій більшості зразків, зменшилась щільність хондроцитів. По мірі збільшення міжклітинного простору зростала кількість гіпертрофованих хондроцитів у стані каріопікнозу, редукція ізогенних груп хондроцитів, що є

морфологічним критерієм дистрофічних змін та пошкодження тіла меніска. На рівні рогів меніска відмічено проліферативні зміни у сполучній тканині й ознаки ангиогенезу.

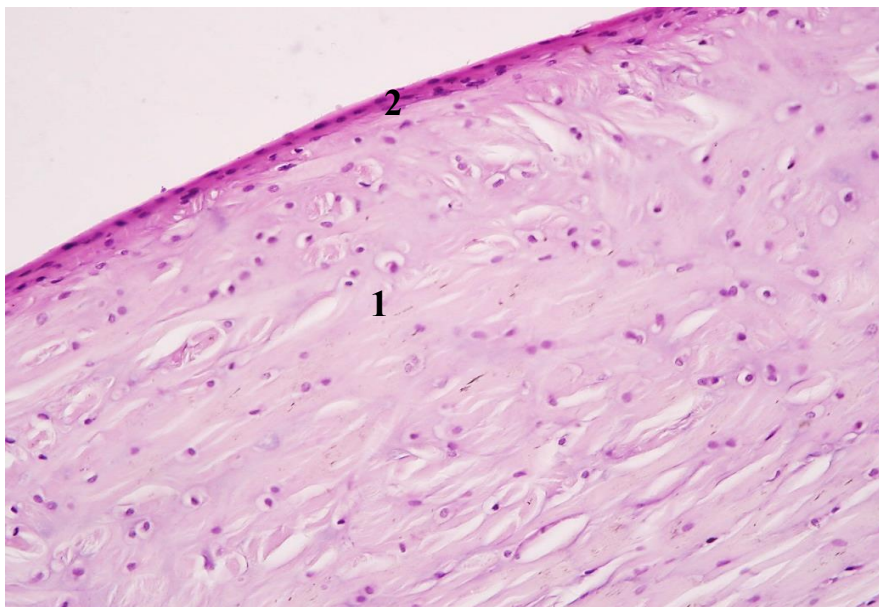
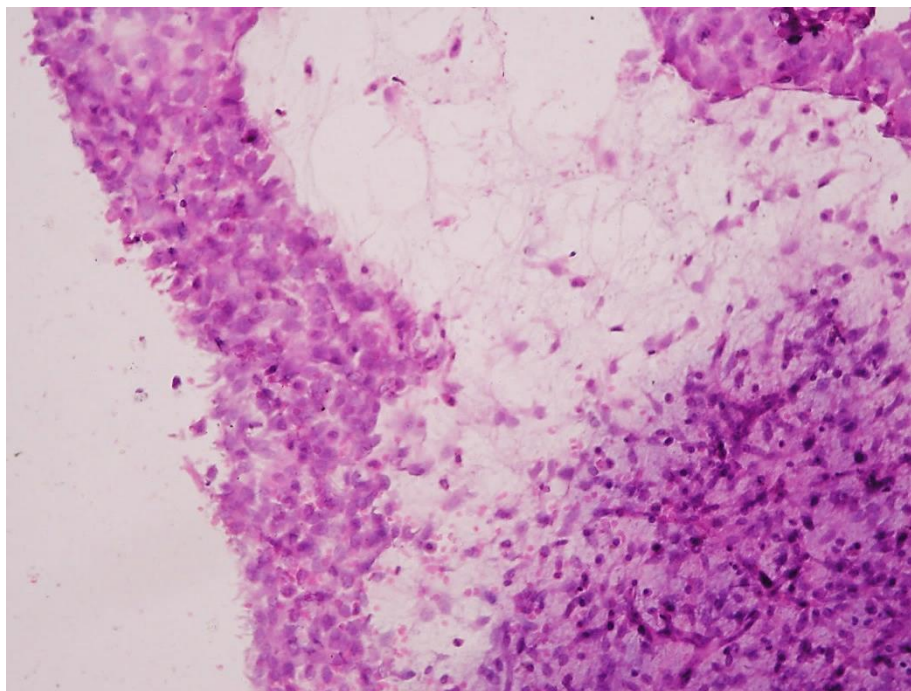


Рис. 4.11. Морфологія меніска колінного суглоба після моделювання остеоартрозу та введення аспірату клітин кісткового мозку. Розволокнення матриксу меніска при збереженні охрястя. 1 – тіло меніска; 2 – охрястя. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У досліджуваних зразках виявлено морфофункціональні ознаки інтеграції клітини з аспірату кісткового мозку. Як вже зазначалось на рівні синовіальної оболонки, навколо тіла меніска також виявлено осередки морфогенезу ретикулярної тканини. Виявлені островці на клітинному рівні формували сітку із ретикулоцитів, між якими додатково реєстрували лімфоцити, поодинокі нейтрофіли і навіть еритроцити (рис. 4.12). Це вказує на те, що клітини введеного аспірату кісткового мозку через 1 місяць залишаються життєздатними, незважаючи на регіональні порушення мікроциркуляції, ішемію та запальний процес. В них відбувається морфогенез ретикулярної тканини та залишкові процеси цитогемопоезу,

А



Б

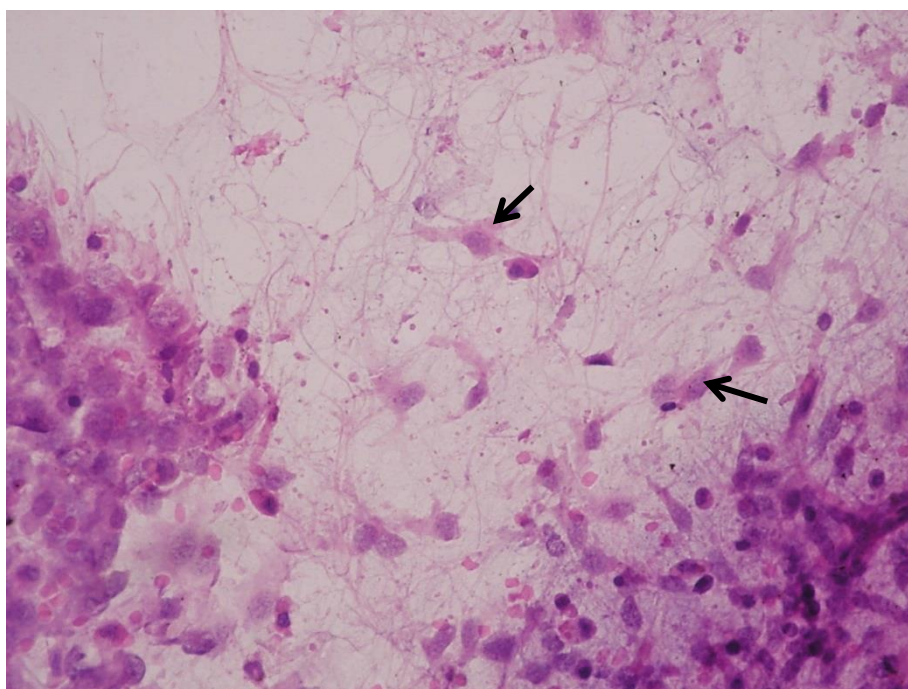


Рис. 4.12. Морфогенез ретикулярної тканини навколо меніска колінного суглоба після моделювання остеоартрозу та введення аспірату клітин кісткового мозку. ← ретикулярні клітини, А – тіло меніска, Б – охрястя. Гематоксилін-еозин. А: об. 20, ок. 10; Б: об. 40, ок. 10.

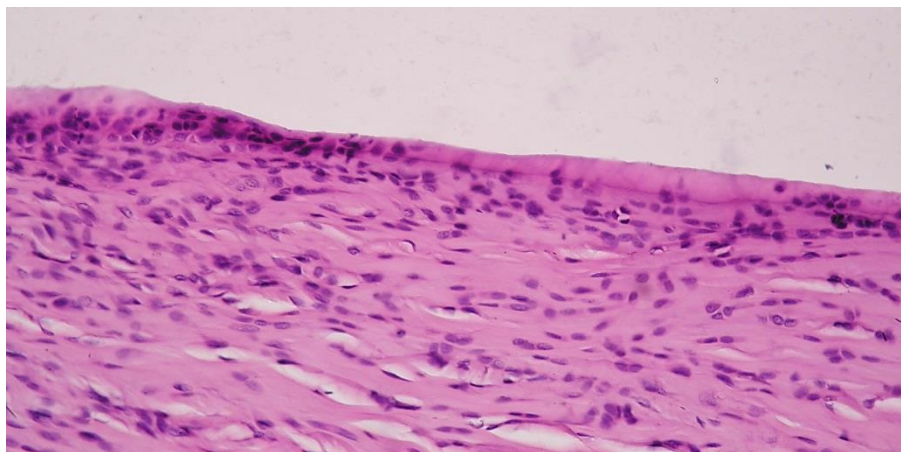
що є специфічним для кісткового мозку. Наявність новоутворених мікросудин також є морфологічним проявом репаративних відновних процесів у пошкодженому колінному суглобі. Додаткова активація є тією гістогенетичною реакцією, яка відрізняє вплив аспірату кісткового мозку від дії ЗТП. Додаткова трофічна підтримка, яка реалізується через формування нової судинної сітки у тканинах суглобу, потенційно є сприятливим чинником у відновних процесах після пошкодження травматичного та ішемічного генезу.

У групі з введенням аспірату жирової тканини також виявлено варіабельні структурні зміни менісків (рис. 4.13). Цілісність охрястя менісків була нерегулярна. Дистрофічні зміни клітин охрястя та поверхневого клітинного шару тіла меніска пов'язані з запальними процесами, які виникли після моделювання остеоартрозу. У структурно збереженому охрясті реєстрували декілька шарів окремих клітин та щільну дрібноклітинну зону хондроцитів зовнішнього шару тіла меніска. Дистрофічні зміни менісків у більшій мірі розвивалися у глибокому шарі (гіпертрофія хондроцитів, набряк клітин, редукція щільності хондроцитів). При цьому матрикс (хондромукоїд) тіла менісків залишався на досить збереженому рівні. Щільність і діаметр безклітинних лакун, при візуальному дослідженні мікроперпаратів, була меншою, у порівнянні із зразками групи без введення клітинних аспіратів. Розволокнення пучків колагенових волокон також було слабо вираженим.

Дія клітин жирової тканини характеризувалась активацією розвитку пухкої сполучної тканини і появою осередків адипоцитів на поверхні меніска. Важливо зазначити, що клітинна інтеграція введених клітинних аспіратів кісткового мозку і жирової тканини відбувалась, головним чином, у суглобовій порожнині, заповнюючи «проміжок» між меніском і суглобовою поверхнею, а також структурно поєднуючись із синовіальною оболонкою.

Таким чином, на основі результатів досліджень морфології менісків колінного суглобу через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу (оцінено як II стадію захворювання), можна стверджувати про розвиток виражених

А



Б

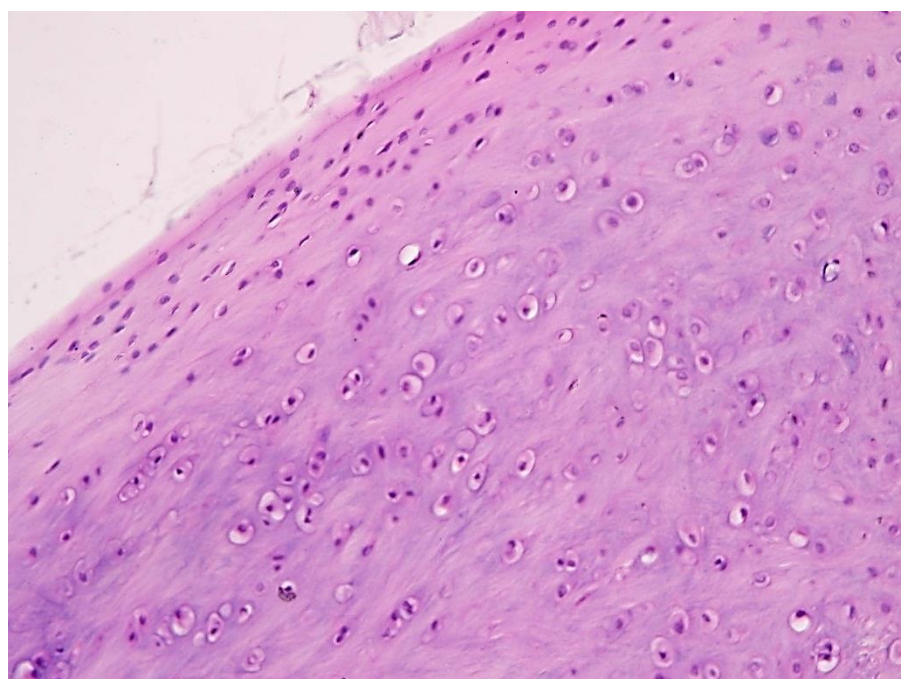


Рис. 4.13. Пошкодження меніска колінного суглоба через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату жирової тканини. Частково збережений меніск (А) і меніск з дистрофічними змінами хондроцитів глибокого шару (Б) тіла меніска. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

деструктивних змін тіла менісків, які патогенетично пов'язані з нестабільністю суглобу, порушеною біомеханікою та додатково ускладнені запаленням і

порушеною мікроциркуляцією. Після введення ЗТП виявлено тенденцію до пригнічення розвитку структурних порушень у тілі менісків (рис. 4.13). Морфологічних проявів додаткового розвитку сполучної тканини або збереження тромбоцитів не виявлено. Після введення аспірату кісткового мозку встановлено проліферативні процеси у сполучній тканині менісків, активацію ангиогенезу та розвиток ретикулярної тканини, як вже зазначалось на рівні синовіальної оболонки. Зроблено висновок про позитивну дію введеного аспірату кісткового мозку на регенеративні процеси навколо меніска, з додатковою реваскуляризацією пошкоджених тканин, що потенційно має сприятливу трофічну підтримку на тлі остеоартрозу. Після введення аспірату жирової тканини процеси інтеграції введених клітин у суглобову порожнину переважно були зосереджені на рівні синовіальної оболонки капсули, хоча у сполучній тканині менісків також виявлено адипоцити, розвиток фіброblastів і новоутворені кровоносні судини. Зроблено висновок, що у порівняльному аспекті тканинні реакції переважно були викликані введенням аспірату кісткового мозку.

4.3. Структурні зміни суглобової поверхні великогомілкової кістки колінного суглоба

При гістологічному дослідженні хрящової поверхні кісток колінного суглоба було виявлено дефект у епіфізі великогомілкової кістки, структурні порушення перифокального хряща, а також явні морфологічні ознаки ураження епіфіза стегнової кістки. У зв'язку з тим, що епіцентр механічного пошкодження великогомілкової кістки був позбавлений хряща, гістологічні та морфометричні дослідження були обмежені перифокальною зоною хряща і субхондральною кістковою тканиною до метафізарної пластинки.

За результатами гістологічних досліджень зроблено висновок про однотиповий характер розвитку структурних змін епіфіза після введення ЗТП і обох клітинних аспіратів. Як і у основній дослідній групі, перифокальна

поверхня суглобового хряща характеризувалась загибеллю ізогенних груп хондроцитів, редукцією їх щільності, а на їх місці виникали безклітинні лакуни, діаметр яких перевищував розмір інтактних лакун з хондроцитами. Цитологічними ознаками дистрофічних змін хондроцитів була гіпертрофія клітин на тлі набряку цитоплазми та каріопікноз. Ці зміни є неспецифічним проявом загибелі хондроцитів, шляхом апоптозу та некрозу. Наступним структурним проявом порушень була зміна контуру субхондральної кісткової тканини і регулярності епіфізарної поверхні. У значній мірі пошкоджувався поверхневий дрібноклітинний шар гіалінового хряща, який у інтактній тканині реалізує процеси морфогенезу суглобової поверхні. Втрата цього шару є потенційно несприятливим структурним пошкодженням, що унеможливорює відновні процеси суглобового хряща. Процес його редукції також відбувався субхондрально, через зміни контуру кісткової тканини з формуванням порожніх лакун. Останнє пов'язано одночасно з двома процесами – проникненням судин у глибокі шари хряща і наступною його дегенерацією (деструкцією хондромукоїду), зменшенням щільності субхондральної кісткової тканини та появою лакун на тлі деструктивних і запальних процесів. Пошкодження суглобового хряща позначилось на його товщині (табл. 4.2).

За результатами морфометричного дослідження у групі з остеоартрозом товщина перифокального хряща великогомілкової кістки була на 43,7 % менше від інтактного хряща ($p < 0,05$). У групі з остеоартрозом та введенням у суглоб ЗТП встановлено статистично значуще зменшення товщини перифокальної зони епіфізарного хряща, в середньому на 17,6 % ($p < 0,05$), що на 18,2 % більше від значень у групі порівняння ($p < 0,05$). Відмічено статистично значущу різницю між цими групами. Це пояснюється дещо кращим рівнем збереження хондроцитів, центральної і у меншій мірі поверхневої зони суглобового хряща (рис. 4.14). З боку стегнової кістки також встановлено дегенеративні процеси суглобової поверхні. Останні зосереджені у поверхневих шарах хряща, вогнищевій втраті дрібноклітинного хряща, тоді як у середній та глибокій зонах зрілого хряща значна щільність ізогенних груп зберігалась.

Результати морфометричної оцінки товщини суглобового хряща
великогомілкової кістки при остеоартрозі

Група	Товщина перифокального хряща, мкм
Контроль	1487,9[1305,5-1666,9]
Остеоартроз	1034,8[412,8-1565,4]*
Остеоартроз + ЗТП	1265,1[878,5-1514,2]*#
Остеоартроз + концентрат аспірату кісткового мозку	965,6[779,4-1178,6]*
Остеоартроз + аспірат жирової тканини	1001,8[653,8-1141,1]*

Примітки:

1. * – достовірно по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
2. # – достовірно по відношенню до групи з остеоартрозом ($p < 0,05$).

У групі з введенням аспірату клітин кісткового мозку також встановлено дистрофічні зміни епіфізарної поверхні великогомілкової кістки (у зразках із запальним інфільтратом також у стегновій кістці) та субхондральної кісткової тканини. Зона дефекту була позбавлена хряща, а товщина перифокального хряща була суттєво зменшеною. Зміни полягали у деструкції поверхневої зони хряща, дистрофії та редукції щільності хондроцитів у поверхневих та глибоких шарах хряща, зміні контуру між епіфізарним хрящем та кістковими пластинками. Дистрофічні зміни призвели до зменшення щільності ізогенних груп хондроцитів, появи порожніх мікролакун і зменшення забарвлення хондромукоїда (рис. 4.15). Перші - ймовірно пов'язані з деформаційним

пошкодженням, а другі - через реорганізацію субепіфізарної кістки. Поява порожніх лакун, або лакун з судинами, вказувала на розвиток остеоартрозу.

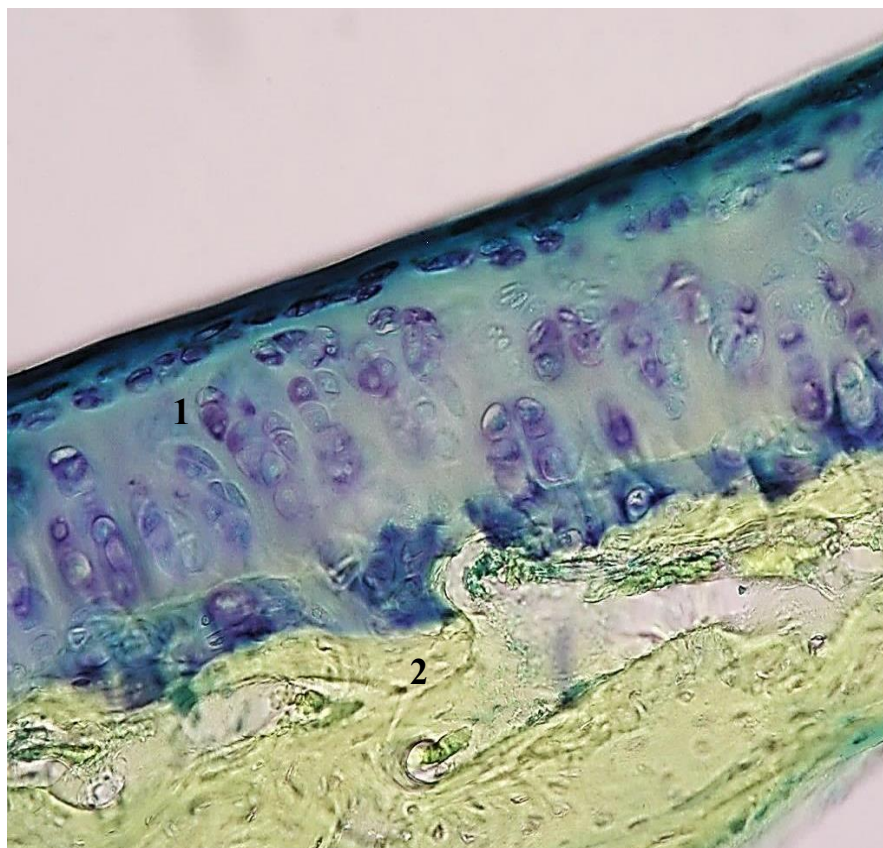
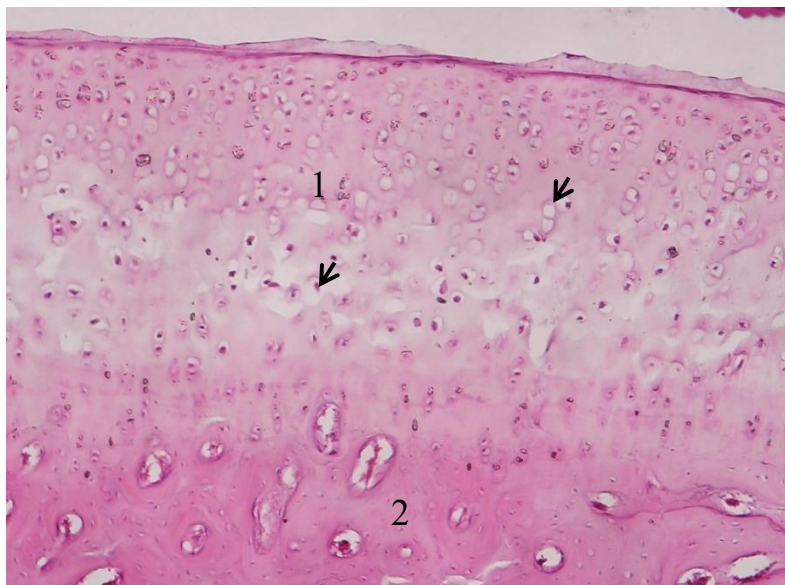


Рис. 4.14. Структура перифокальної зони епіфіза великогомілкової кістки через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення ЗТП. Частково збережена суглобова поверхня. Примітка: 1 – епіфізарний хрящ; 2 – кісткова тканина. Збарвлення толуїдиновим синім. Об. 40, ок. 10.

А



Б

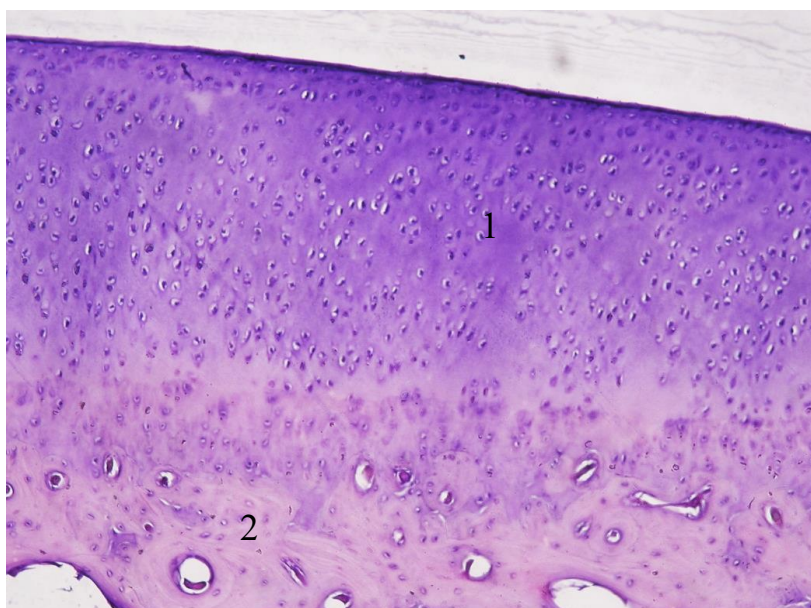


Рис. 4.15. Структура суглобових поверхонь великогомілкової (А) та стегнової (Б) кістки через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату кісткового мозку. Дистрофічні зміни хондроцитів гіалінового хряща, поява безклітинних лакун у епіфізарному хрящі. Примітки: 1 – епіфізарний хрящ; 2 – кісткова тканина; ← лакун. Зabarвлення гематоксиліном та еозином (А), толуїдиновим синім (Б). Об. 10, ок. 10.

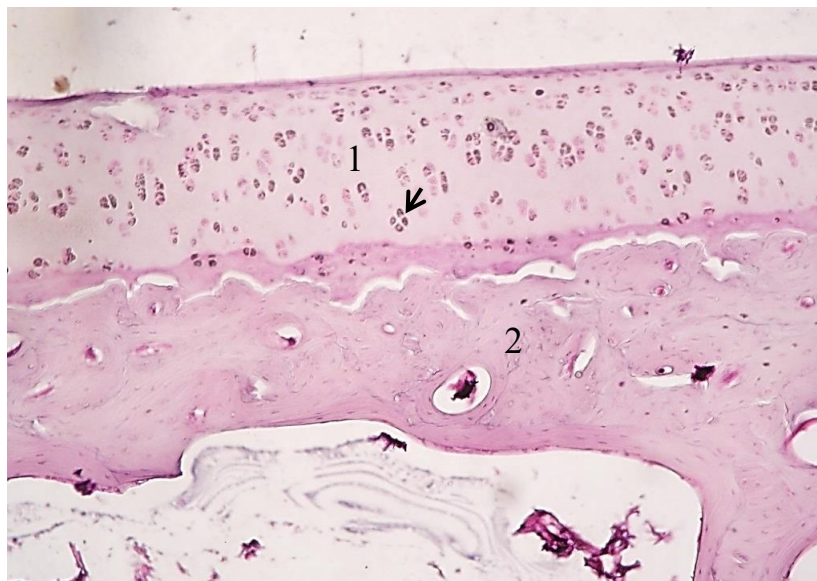
Зміни встановлено як у поверхневих, так і глибоких шарах хряща. За

даними морфометрії товщина перифокального хряща зменшилась на 54,1 % ($p < 0,05$), тобто кількісні показники не відрізнялись від групи порівняння без введення клітинних аспіратів. Це пояснюється значним пошкодженням та розвитком дегенеративних змін хрящової тканини. Слід зазначити, що пошкодження суглобової поверхні відбулись і у епіфізарній поверхні стегнової кістки. Дистрофічні зміни поверхневого шару гіалінового хряща (пошкодження і некроз хондроцитів, деструкція хондромукоїду) також позначились на зміні поверхневого контуру хряща (поява деформацій і нерегулярної щільності ізогенних груп хондроцитів).

У групі з введенням аспірату жирової тканини структурні зміни були подібними до тих, що описано у групі з аспіратом клітин кісткового мозку. Також виявлено неспецифічні ознаки дегенеративних змін суглобового хряща: некроз хондроцитів, редукція щільності ізогенних груп клітин, формування на місці загиблих хондроцитів безклітинних лакун, зменшення щільності та інтенсивності забарвлення хондромукоїду (рис. 4.16). Усі перераховані структурні зміни позначились на товщині перифокального хряща. Редукція хряща, в середньому, становила 48,5 % ($p < 0,05$) (табл. 4.2). Статистично значущої різниці з основною дослідною групою не встановлено, як і з групою після введення аспірату кісткового мозку. Суглобова поверхня стегнової кістки мала кращий ступінь збереження. При візуальному аналізі спостерігалась більша щільність ізогенних груп клітин, але значна кількість хондроцитів із ознаками дистрофічних змін також була виявлена. Результати гістологічних досліджень вказують на те, що ізольоване пошкодження суглобового хряща не обмежується первинною локалізацією і призводить до прогресуючих змін інших структурних утворень колінного суглобу.

У таблиці 4.3 наведено результати напівкількісного аналізу за шкалою Fitzgerald J (2008). З наведених кількісних даних можна зробити висновок, що суттєвих відмінностей розвитку загально-патологічних процесів між дослідними групами у проведених експериментах виявлено не було.

А



Б

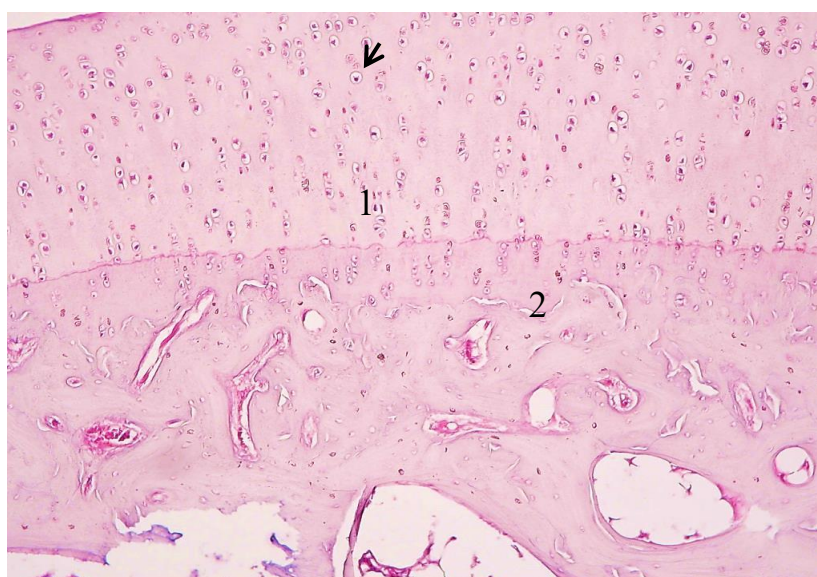


Рис. 4.16. Структура перифокальної зони суглобових поверхонь великогомілкової (А) та стегнової (Б) кістки через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату жирової тканини. Дистрофічні зміни хондроцитів із появою безклітинних лакун у епіфізарному хрящі. 1 – епіфізарний хрящ; 2 – кісткова тканина; ← ушкоджені хондроцити у лакунах. Забарвлення гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Це пояснюється тим, що моделювання остеоартрозу спричинило значне прогресуюче пошкодження суглобової поверхні та втрату клітинних елементів гіалінового хряща. Дегенеративні зміни поверхневого шару хряща унеможливають розвиток відновних процесів. Тому вплив клітинних аспіратів та ЗТП був обмежений менісками та синовіальною оболонкою суглобу.

Таблиця 4.3

Кількісна оцінка структурних порушень епіфіза великогомілкової кістки через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення клітинних аспіратів

Показник	Контроль	Остеоартроз	Остеоартроз + ЗТП	Остеоартроз + концентрат аспірату кісткового мозку	Остеоартроз + аспірат жирової тканини
Клітинна морфологія хряща	4	3[1,5-3]	3[3-3]	2[1-3]	3[2-3]
Забарвлення матриксу	3	1[0,5-2]	1[1-2]	2[1-2]	2[1,5-2]
Регулярність поверхні хряща	3	2[0,5-2]	2[2-2]	2[1-2,5]	2[1,5-2]
Товщина хряща	2	1[0,5-1,5]	2[1,5-2]	2[0,5-2]	2[1,5-2]
Інтеграція хрящових основ	2	2[1-2]	2 [2-2]	2[1,5-2]	2[1,5-2]
Me[Q1-Q3]	14	9[4-10,5]	10[9,5-11]	9[5-11,5]	11[8-11]

Таким чином, при аналізі структури хрящової поверхні великогомілкової кістки колінного суглобу через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу, застосування ЗТП та обидвох типів клітинних аспіратів, було встановлено, що експериментальна модель характеризується прогресуючими дегенеративно-дистрофічними змінами суглобових поверхонь кісток, які досягають стану II стадії патологічного процесу. Остеоартроз характеризується розвитком місцевого запалення та дистрофічними змінами меніска і капсули суглобу. Пошкодження гіалінового хряща було прогресуючим, що морфометрично і статистично доведено на термінах 1,5 і 2,5 місяців експерименту ($1277,7 \pm 8,19$ мкм проти $1035,8 \pm 5,73$, тобто на 18,9 %, $p = 0,04$ за критерієм Манна-Уїтні).

Перебіг дегенеративних змін після введення ЗТП і клітинних аспіратів був неспецифічним і мав усі описані морфологічні ознаки, які виявлено у основній дослідній групі. Вираженого збереження суглобового хряща великогомілкової кістки після введення клітинних аспіратів не виявлено. Часткове збереження хондроцитів у глибоких шарах хрящової тканини не позначилось на збереженні товщини хряща після введення клітин кісткового мозку та жирової тканини. Тільки у групі з ЗТП встановлено статистично більшу товщину суглобового хряща, проте, враховуючи значну редукцію ізогенних груп хондроцитів у перифокальному хрящі, зроблено висновок про прогресуючі дистрофічні процеси, які, ймовірно, були частково пригнічені після введення ЗТП, але й прогресували і у подальші періоди. Редукція суглобової поверхні відбувалась із поверхневого дрібноклітинного шару. Це дозволяє припустити про необхідність додаткової корекції метаболічного стану (середовища) у синовіальній порожнині. Одночасно з цим у глибоких шарах хряща відмічено порожні лакуни на межі з кістковою тканиною, поява яких пояснюється деструктивними змінами на рівні субхондральної кісткової тканини.

4.4. Дослідження субхондральної кісткової тканини великогомілкової кістки колінного суглоба

Деструктивні процеси в епіфізарній поверхні великогомілкової кістки позначаються на стані кісткової тканини і червоного кісткового мозку. У субхондральній кістці зменшувалась щільність кісткових трабекул, з'являлись порожні лакуни, що є свідченням як резорбції, так і посттравматичної деформації. При запальній інфільтрації щільність кісткового мозку зменшилась до 20 %, порівняно з 66,1 % у контрольних тварин і частково була заміщена фіброзною тканиною. Різницю між групами порівняння встановлено морфометрично (табл. 4.4). У всіх дослідних групах

Таблиця 4.4

Зміни відносної щільності субхондральної кісткової тканини епіфіза великогомілкової кістки при остеоартрозі

Група	Щільність субхондральної кісткової тканини, %
Контроль	66,1[53,3-69,4]
Остеоартроз	37,0[34,5-45,5]*
Остеоартроз + ЗТП	48,7[46,4-66,7]*#
Остеоартроз + аспірат кісткового мозку	52,6[39,8-58,4]*#
Остеоартроз + аспірат жирової тканини	47,9[34,7-56,1]*

Примітки:

1. * – достовірно щодо контролю ($p < 0,05$);
2. # – достовірно щодо групи з остеоартрозом ($p < 0,05$).

мало місце зменшення щільності субхондральної кісткової тканини. Якщо у основній дослідній групі збереженою залишилась 55,9 % субепіфізарної кістки

від вихідних значень у інтактній великогомільковій кістці, то у групі з ЗТП – 73,7 % ($p < 0,05$), у групі з аспіратом кісткового мозку – 79,5 %. Слід зазначити, що щільність кісткових трабекул після застосування аспірату кісткового мозку також була неоднорідно, виявлено значну їх варіабельність (рис. 4.17).

Наступним проявом, який пов'язаний з введенням клітинного аспірату, було часткове або тотальне заміщення кісткового мозку у субхондральних лакунах епіфізарної губчастої кістки фіброретикулярною тканиною. Останнє можна пояснити розвитком фіброзних змін на тлі запального процесу та заміщенням гемопоетичних острівців. У зразках без ознак запальної реакції у лакунах губчастої кісткової тканини виявлено дрібні гемопоетичні острівці, а також значну кількість адипоцитів, тобто вмісту жирової тканини.

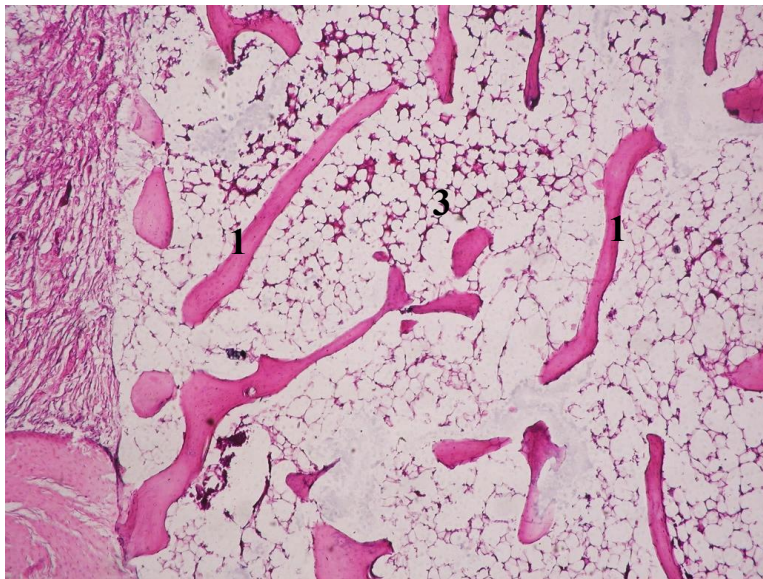
У групі з аспіратом жирової тканини відносна щільність субхондральної кісткової тканини становила 72,4 % ($p < 0,05$). У порівнянні з основною дослідною групою показники були у межах статистичної похибки. Слід відмітити значну кількість адипоцитів у червоному кістковому мозку, серед яких реєстрували поодинокі гемопоетичні острівці (рис. 4.18).

Часткову втрату кісткового мозку пов'язано з розвитком запальних процесів у епіфізарній поверхні та деформаційним пошкодженням. Втрата гемопоетичних острівців є негативним наслідком остеоартрозу і свідчить про порушення регіонального гемопоезу у пошкодженій кістці.

Таким чином, після введення ЗТП та аспірату кісткового мозку щільність кісткової тканини була достовірно більшою, порівняно з дослідною групою без застосування клітинних технологій ($p < 0,05$). Додатково при застосуванні методу кореляційного аналізу (критерій Спірмена) дало можливість виявити пряму залежність між пошкодженням субхондральної кістки з капсули суглобу ($r = - 0,949$; $p < 0,05$) і пошкодженням суглобового хряща ($r = 1,00$; $p < 0,001$) у цих групах (табл. 4.5).

Важливо, що сильна кореляція спостерігалась у групі з використанням аспірату кісткового мозку ($r = 1,00$; $p < 0,001$). Слід відмітити, що високий

А



Б

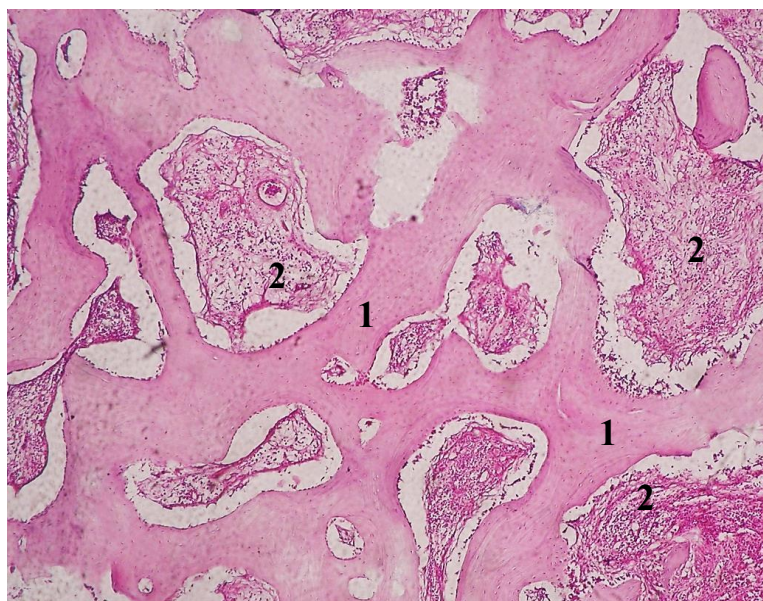


Рис. 4.17. Зміни щільності субхондральної кісткової тканини епіфіза великогомілкової кістки через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату кісткового мозку. Неоднорідна щільність кісткових трабекул (А), заміщення кісткового мозку фіброретикулярною тканиною (Б). 1 – кісткові трабекули; 2 – фіброретикулярна тканина; 3 – кістковий мозок із домінуванням клітин жирової тканини. Зabarвлення гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

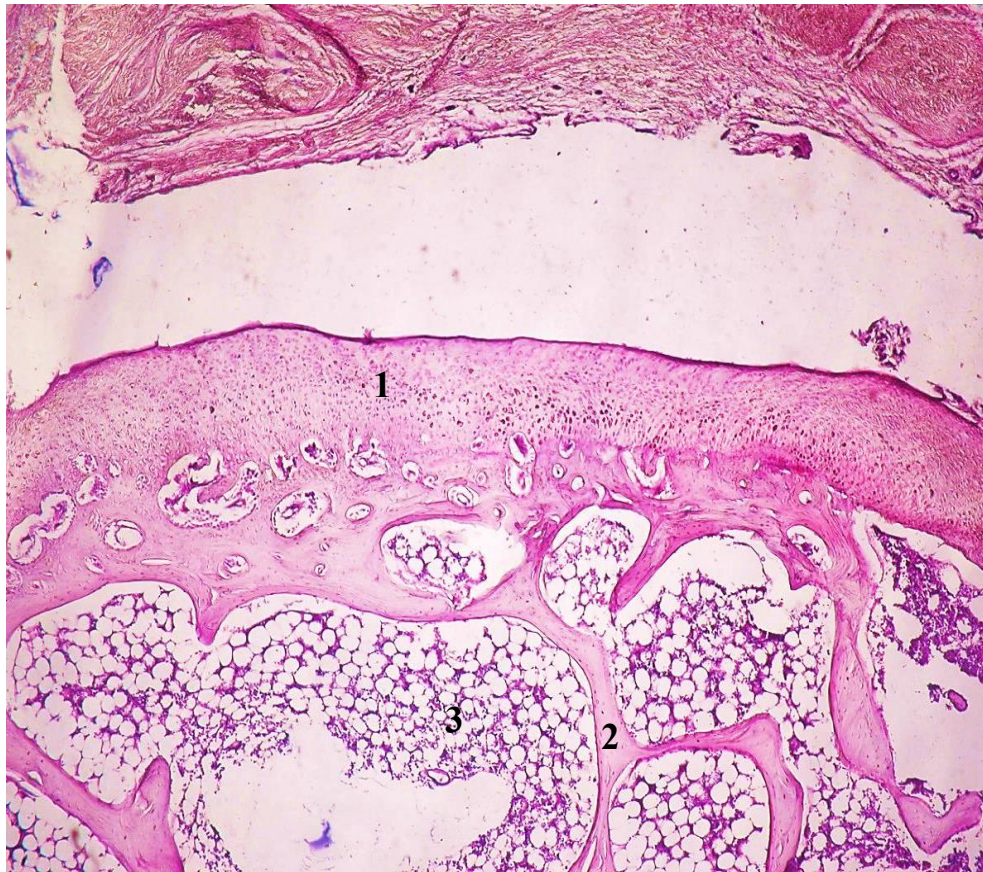


Рис. 4.18. Дистрофічні зміни суглобового хряща, часткове збереження кісткового мозку в субхондральній кістковій тканині епіфіза великогомілкової кістки через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу та введення аспірату жирової тканини. 1 – епіфізарний хрящ; 2 – кісткові трабекули; 3 – кістковий мозок із домінуванням клітин жирової тканини. Забарвлення толуїдиновим синім. Об. 40, ок. 10.

ступінь кореляції також відмічали у групах з використанням аспірату жирової тканини ($r = -0,949$; $p < 0,05$) і в групі з ЗТП ($r = -0,949$; $p < 0,05$). Результати вказують на те, що після моделювання II стадії остеоартрозу, та за умов введення клітин кісткового мозку, є пряма залежність між пошкодженням суглобового гіалінового хряща та пошкодженням субхондральної кісткової тканини. Тоді як у групі із ЗТП та клітинами жирової тканини на редукцію щільності кісткової тканини вплинули додатково інші чинники, найімовірніше, розвиток запальної реакції.

Результати кореляційного аналізу між ступенем пошкодження структур колінного суглоба

Коефіцієнт кореляції Спірмена		Щільність субхондральної кісткової тканини, %			
		Остеоартроз	Остеоартроз + ЗТП	Остеоартроз + аспірат кісткового мозку	Остеоартроз + аспірат жирової тканини
Пошкодження капсули	r-Спірмена	-0,949	-0,949	-0,866	-0,949
	рівень достовірності	0,007	0,007	0,167	0,007
Пошкодження суглобового хряща	r-Спірмена	1,000	0,630	1,000	0,738
	рівень достовірності	-	0,250	-	0,131

У таблиці 4.6 наведено результати кореляційного аналізу між рівнем пошкодження капсули суглоба і суглобового хряща. Як видно з рівнем r-коефіцієнтом Спірмена, сильний зв'язок у групі без застосування клітинних технологій ($r = -0,950$; $p = 0,01$) вже був відсутній за умов їх введення.

Це вказує на те, що кожен з трьох підходів позначився на рівні пошкодження колінного суглоба. Одержані результати дозволили зробити висновок, що саме застосування аспірату кісткового мозку достовірно впливає на пригнічення розвитку деструктивних змін колінного суглобу при травматичному остеоартрозі (оскільки є сильна кореляція між показником пошкодження хряща і кісткової тканини), а при використанні жирової тканини зміни відбуваються переважно в капсулі. Позитивною дією аспірату кісткового мозку була інтеграція новоутвореної ретикулярної тканини з капсулою меніска.

Таблиця 4.6

Кореляційний зв'язок між ступенем пошкодження суглобового хряща і капсули колінного суглобу

Коефіцієнт кореляції Спірмена		Пошкодження суглобового хряща			
		Остео-артроз	Остео-артроз + ЗТП	Остео-артроз + аспірат кісткового мозку	Остео-артроз + аспірат жирової тканини
Пошкодження капсули	г-Спірмена	-0,950	-0,560	-0,866	-0,778
	рівень достовірності	0,010	0,330	0,167	0,111

Ці результати вказують на те, що клітини кісткового мозку викликають реорганізацію капсули меніска на тлі морфогенезу й інтеграцію ретикулярної тканини навколо меніска, тоді як ЗТП та жирова тканина тільки зменшують деградацію хрящового тіла меніска.

Заключення до розділу 4

Структурні зміни епіфіза великогомілкової кістки при розвитку II стадії остеоартрозу є прогресуючими і призводять до дистрофічних змін суглобової поверхні, субхондральної кістки, меніска та капсули суглоба. Пошкодження капсули викликають розшарування структурних елементів фіброзної оболонки, зменшення щільності клітин синовіальної оболонки шляхом некрозу, дистрофічних змін клітин синовіальної мембрани. Перетин медіальної зв'язки спричинив нестабільність суглоба та зміну біомеханіки, що призвело до пошкодження менісків. Обмежене механічне пошкодження суглобової поверхні не обмежується зоною деформації і прогресує на оточуючі ділянки гіалінового

хряща та субхондральну кісткову тканину, що призводить до їх зменшення та часткової втрати червоного кісткового мозку. Встановлено сильну кореляцію між змінами у капсулі, гіаліновому хрящі та субхондральній кістковій тканині.

Комплексний аналіз структурних утворень колінного суглоба дозволив встановити реакції тканин колінного суглоба на введення ЗТП та клітинних аспіратів. Встановлено тенденцію пригнічення розвитку дистрофічних змін у суглобовому хрящі і субхондральній кістковій тканині після введення ЗТП. Введення аспірату кісткового мозку пригнічувало розвиток реорганізації кісткової тканини, але достовірно не позначилось на процесі дистрофічних змін у гіаліновому хрящі. Після введення жирової тканини достовірної різниці з основною групою не встановлено, як на рівні морфометричних показників хрящової поверхні, так і в субхондральній кістці.

Разом з тим, застосування клітинних аспіратів викликало розвиток тканинних реакцій у порожнині пошкодженого колінного суглоба. Через 1 місяць після їх введення, тобто через 2,5 місяці після моделювання остеоартрозу, осередки інтеграції клітин, які походять з аспіратів, були виявлені, і це доводить їх життєздатність на тлі патологічного процесу.

Дія аспірату кісткового мозку полягала у збільшенні щільності фібробластів у капсулі суглобу і збереженні сполучної тканини поверхні менісків, розвитку ретикулярної тканини у порожнині суглобу. Тканинні реакції є наслідком інтеграції клітин аспірату кісткового мозку з синовіальною оболонкою та менісками з наступною реваскуляризацією тканини.

Дія клітин жирової тканини полягала у формуванні «ніжної» сполучної тканини з адипоцитами у синовіальній оболонці капсули і частково у сполучній тканині менісків. Небажаною реакцією у відповідь на введення аспірату жирової тканини є запальна реакція, яка, очевидно, є реакцією лімфоїдних імунних клітин та продуктів розпаду загиблих клітин, які утворилися після часткової гомогенізації жирової тканини. Цим можна пояснити відсутність захисного впливу щодо пригнічення структурних змін субхондральної кісткової тканині та кісткового мозку.

Реорганізація і часткова інтеграція аутологічних тканинних аспіратів у синовіальній оболонці є свідченням їх життєздатності та потенційної регенерації, на що вказує ангиогенез.

Список опублікованих праць до розділу 4:

1. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Вивчення структурних особливостей при експериментальному хронічному остеоартрозі колінного суглоба в кролів. Травма. 2018;19(6):71-76. *(Особистий внесок – аналіз отриманих даних, статистична обробка та узагальнення результатів експериментів, підготовка статті до друку).*

2. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Структурні порушення колінного суглоба при моделюванні остеоартрозу. Травма. 2019;20(1): 73-78. *(Особистий внесок – автор самостійно проводив експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів).*

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗІ КОЛІННОГО СУГЛОБА

5.1. Результати дослідження продуктів пероксидації та ферментативної активності лейкоцитів крові

Як показали результати гістологічних досліджень (див. розділ 3 і 4), через 2,5 місяця після моделювання остеоартрозу у суглобовій поверхні великогомілкової кістки дослідних тварин виникають структурні порушення, які полягають у дистрофічних змінах хрящової тканини, редукції щільності хондроцитів, зменшенні товщини суглобової поверхні. Пошкодження структурних утворень суглобу не обмежується лише загибеллю хондроцитів, набряком та втратою хряща, виявлено пошкодження клітин синовіальної оболонки капсули, дистрофічні зміни меніска та інфільтрацію лейкоцитів навколо окремих судин. Останнє є морфологічним проявом запальної реакції у суглобі. Оцінка запального процесу, особливостей та напрямків розвитку, а головне редукції запалення та відновлення при застосуванні клітинних технологій, є непростим завданням. Для цього проведено додаткове дослідження, яке полягало у вивченні показників ферментативної активності лейкоцитів крові, оскільки інфільтрація запальних клітин у суглоб відбувається саме із периферійної крові. У пошкоджений суглоб мігрують лейкоцити і виділяють протеїнази, зокрема, еластазу і мієлопероксидазу нейтрофілів [156]. Збільшення рівня протеолітичних ферментів у синовіальній рідині і тканинах суглобу руйнує колаген та протеоглікани суглобового хряща [157], що є однією з основних причин прогресуючого руйнування суглобів [158]. Хрящові поверхні колінного суглобу позбавлені судин, а трофіка відбувається через судини синовіальної капсули. Тому пошкодження судин капсули ще більш погіршує стан суглобу з остеоартрозом [159]. За рівнем активності ферментів

нейтрофілів можна стверджувати про наявність запального процесу, а за концентрацією продуктів пероксидації (дієнові кон'югати, ТБК-активні продукти, продукти вільнорадикального окислення білків (ПВОб)) про ступінь пошкодження тканин та метаболічні зміни у організмі.

Результати власних досліджень показали прозапальний стан лейкоцитів крові у тварин з остеоартрозом. Показники активності лізосомальних ферментів нейтрофілів периферійної крові – еластази і мієлопероксидази – були вірогідно збільшені порівняно з контролем відповідно у 2,1 і 2,7 рази ($p < 0,05$). Це вказує на збільшену фагоцитарну активність лейкоцитів, а саме прозапальний стан нейтрофілів. Якщо активність цих ферментів є прямим свідченням стану лізосом фагоцитів, то параоксидаза-1 є ферментом, який перешкоджає окисленню ліпідів, диференціюванню моноцитів в макрофаги, захоплення цими клітинами окислених ліпідів і перетворенню їх в пінисті клітини [160]. Активність параоксидази-1 у тварин з остеоартрозом була вірогідно меншою в 1,8 рази ($p < 0,05$). Це також вказує на зміну прозапальної активності фагоцитів крові у напрямку її збільшення.

Наступними показниками, які оцінені у дослідженні були ферменти та продукти окисних реакцій, за якими можна стверджувати про ступінь пошкодження тканини та стану антиоксидантної системи організму. Так, встановлено статистично значуще збільшення вмісту продуктів окиснення ліпідів і білків – дієнових кон'югатів (у 1,7 рази), ТБК-активних продуктів (у 2,1 рази) і продуктів окисної модифікації білків (у 1,4 рази) ($p < 0,05$). Показники ферментативних і неферментативних складових антиоксидантної системи крові були вірогідно знижені порівняно з контролем – активність каталази у 1,4 рази, СОД у 1,3 рази, рівень відновленого глутатіону у 1,7 рази ($p < 0,05$). Це свідчить про фізіологічну нейтралізацію та часткове виснаження антиоксидантної системи при розвитку запальної реакції суглобів. Доказом запалення також є збільшений рівень плазмового церулоплазміну. Його рівень зростав порівняно з контрольними значеннями на 44,3 % ($p < 0,05$). Результати біохімічних досліджень наведено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Біохімічні показники крові у кролів з експериментальним остеоартрозом та при введенні ЗТП

Показник	Контроль	Остеоартроз	Остеоартроз + ЗТП
Активність лейкоцитарної еластази, нмоль/мл×хв	0,28 ± 0,02	0,60 ± 0,04*	0,41 ± 0,03***
Активність мієлопероксидази, ΔЕ460/хв	0,0021 ± 0,0003	0,0057 ± 0,0004*	0,0038 ± 0,0006**
Церулоплазмін, мг/л	532,71 ± 14,50	769,04 ± 24,68*	645,31 ± 47,47
Дієнові кон'югати, ум. од./мл	17,85 ± 0,55	30,29 ± 1,44*	22,25 ± 1,25***
ТБК-активні продукти, ум. од./мл	33,23 ± 2,02	69,04 ± 1,98*	54,20 ± 2,42***
Продукти вільнорадикального окислення білків, ум. од./мл	105,4 ± 2,55	150,37 ± 3,89*	35,35 ± 4,61***
Активність каталази, мкат/мл за год	152,11 ± 13,92	106,10 ± 5,30*	126,20 ± 4,30
Активність СОД, од./мл за хв	12177,7 ± 1177,6	8961,7 ± 479,9*	11958,2 ± 981,5
Активність параоксонази-1, кU/л	4,27 ± 0,38	2,41 ± 0,22*	3,01 ± 0,33*
Відновлений глутатіон, ммоль/л	7,79 ± 0,80	4,66 ± 0,24*	6,89 ± 0,56**

Примітка:

1. * – $p < 0,05$ – вірогідно по відношенню до контролю;
2. ** – $p < 0,05$ – вірогідно по відношенню до групи з остеоартрозом.

Таким чином, результати біохімічних досліджень засвідчили прозапальний характер змін досліджуваних показників крові у тварин з

експериментальним остеоартрозом. Відомо, що ферменти еластаза і мієлопероксидаза містяться головним чином у нейтрофілах, найбільш чисельній групі лейкоцитів крові та вивільнюються при їх активації. Активність цих ферментів є показником розвитку запальної реакції при артриті й остеоартрозі [161, 162]. Активність мієлопероксидази має зворотню залежність з церулоплазміном, який протидіє прозапальній активності нейтрофілів [163, 164]. Церулоплазмін є білком гострої фази, високий рівень якого, при остеоартрозі є відповіддю антиоксидантної системи на запалення у колінному суглобі та може вказувати на його можливу захисну роль при запаленні, як це відмічали у пацієнтів з ревматоїдним артритом [165, 166]. Але у наших дослідженнях виявлено значне збільшення концентрації плазмового церулоплазміну, що є фізіологічною реакцією при запаленні, та зменшення активності СОД і каталази. Це може вказувати на виснаження захисних механізмів при прогресуючих дистрофічних процесах у суглобі, у відповідь на гіперпродукцію продуктів окисної модифікації ліпідних та білкових молекул, що може призводити до прогресуючого ураження тканин колінного суглобу.

5.2. Відновлення показників крові при остеоартрозі та застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми

Наступним етапом роботи було дослідження змін оцінених показників крові у тварин з остеоартрозом після застосування ЗТП. За результатами гістологічних досліджень (див. розділ 4), встановлено вірогідне зменшення дистрофічних змін суглобового хряща після локального використання ЗТП, що було підтверджено морфометричним методом (збільшення товщини суглобового хряща на 22,2 % ($p < 0,05$)). У цьому дослідженні ми висунули гіпотезу, що ЗТП сприяє підтримці суглобового хряща при експериментальному остеоартрозі, тим самим зменшуючи інтенсивність запалення і пошкодження суглобу, що можна оцінити за біохімічними показниками крові.

Результати біохімічних досліджень описано у таблиці 5.1. Застосування ЗТП через 1,5 місяці після початку моделювання остеоартрозу призводило до вірогідного (відносно групи тварин з експериментальним остеоартрозом) зменшення активності еластази і мієлопероксидази (зменшення на 31,6 % і 33,3 % відповідно, $p < 0,05$), вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів (дієнових кон'югатів на 26,5 %, ТБК-активних продуктів на 21,5 %, $p < 0,05$) та білків (на 10,0 %, $p < 0,05$) і зростання рівня відновленого глутатіону (на 47,8 %, $p < 0,05$) впродовж 1 місяця. При цьому показники прозапальної активності лейкоцитів крові (активність еластази і мієлопероксидази), активності параоксонази-1 і вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів та білків не досягали контрольних значень, але були вірогідно кращими, ніж в групі тварин, яким не вводили ЗТП. У жодному з експериментальних випадків, де було застосовано ЗТП, не виявлено погіршення досліджуваних показників крові, які можуть вказувати на прогресування запалення та пошкодження тканин в організмі, що є свідченням біологічної безпечності ЗТП при введенні у колінний суглоб.

Таким чином, власні дані свідчать про те, що збільшення активності еластази і мієлопероксидази у крові є доказом розвитку запального процесу в організмі, а вірогідне зниження активності цих ферментів при застосуванні ЗТП вказує на пригнічення прозапального фенотипу лейкоцитів периферійної крові і гальмування процесу запалення. Після введення у суглоб ЗТП встановлено зменшення вмісту продуктів окисної модифікації ліпідів та білків і зростання рівня відновленого глутатіону у крові, що свідчить про достовірне зменшення вторинного пошкодження тканин при запаленні й активації процесів відновлення. Ці результати узгоджуються з гістологічними даними про запобігання деградуючих змін у тканинах капсули і суглобовому хрящі після введення ЗТП. Наша робота – це перше дослідження, яке описує можливість позитивного впливу на ланки запальної реакції у крові при експериментальному остеоартрозі після введення ЗТП. Вимірювання величин, досліджуваних у роботі біохімічних показників, може служити корисним додатковим діагностичним маркером в оцінці ефективності лікування

остеоартрозу, а також профілактики судинних ускладнень.

5.3. Біохімічні зміни показників крові при остеоартрозі та після введення аспіратів кісткового мозку та жирової тканини

Через 1 місяць після введення у колінний суглоб тваринам з остеоартрозом (тобто через 2,5 місяці після операції) клітинних аспіратів кісткового мозку та жирової тканини, виявлено часткове відновлення прооксидантно-антиоксидантного балансу, що знайшло своє відображення у біохімічних показниках крові. Достовірно зменшився рівень ТБК-активних продуктів в обох групах порівняння (відповідно на 18,3 % і 16,4 %, $p < 0,05$), продуктів окисної модифікації білків – лише у групі з аспіратом жирової тканини (на 9,2 %, $p < 0,05$), спостерігається тенденція до зменшення дієнових кон'югатів у обох групах порівняння (табл. 5.2). Активність лейкоцитарної еластази не змінилась і залишилась на підвищеному рівні, тоді як активність мієлопероксидази достовірно зменшилась на 54,3 % і 70,1 % ($p < 0,05$). Тобто прозапальна активність лейкоцитів частково зменшилась, що є проявом відновного процесу.

При цьому виявлено збільшення активності ферментів антиоксидантної системи, зокрема, СОД і параоксонази-1. Вони досягли майже контрольних значень. Показник активності каталази також мав тенденцію до нормалізації у групі з аспіратом клітин кісткового мозку: не виявлено статистично значущої різниці щодо контрольної групи і групи з остеоартрозом (значення на межі статистичної похибки). У групі з аспіратом жирової тканини позитивних змін активності каталази не виявлено. Рівень відновленого глутатіону, який збільшився на 39,3 % і 41,8 % ($p < 0,05$), з урахуванням зазначених показників, вказує на значно меншу активність процесів пероксидації. Це опосередковано вказує на зменшення процесу запалення в організмі дослідних тварин з остеоартрозом і частково підтверджується нижчим рівнем церулоплазміну (на 16,5 % і 24,5 % відповідно, $p < 0,05$). При цьому статистично значущої різниці між групами з клітинними аспіратами не виявлено, тобто метаболічна відповідь

організму на їх введення була еквівалентною.

5.4. Результати кореляційного аналізу зв'язку біохімічних показників та ступеня пошкодження колінного суглобу

За результатами гістологічних та біохімічних досліджень встановлено прогресуюче пошкодження (між термінами 1,5 і 2,5 місяці) та альтерацією суглобового хряща на моделі остеоартрозу II стадії. Як і очікували, пошкодження суглобового хряща позначилось на показниках крові (табл. 5.3). Виявлено сильну кореляцію між активністю лейкоцитарної еластази і ступенем пошкодження хряща ($r = 0,90$; $p = 0,04$), капсули суглобу ($r = 0,94$; $p = 0,007$) і субхондральної кісткової тканини ($r = 0,90$; $p = 0,01$). При остеоартрозі у плазмі крові зростає рівень продуктів пероксидації. Ці результати корелювали із збільшеним рівнем ТБК-активних продуктів ($r = 0,90$; $p = 0,01$) та дієнових кон'югатів ($r = 0,90$; $p = 0,01$). У додаток до цього, сильну кореляцію встановлено між збільшенням у плазмі крові продуктів окисної модифікації білків і церулоплазмину ($r = 0,90$; $p = 0,01$). Дані щодо змін рівня церулоплазмину виявились цікавими. Зменшення його рівня корелювало з більшою щільністю субхондральної кістки, за умов введення ЗТП та аспірату клітин кісткового мозку. За цим показником можна прогнозувати напрям розвитку захворювання прогресуючого остеоартрозу або динаміку у бік відновних процесів.

Таблиця 5.2

Результати біохімічних досліджень сироватки крові тварин з остеоартрозом

Показник	Контроль	Остеоартроз	Остеоартроз + концентрат аспірату кісткового мозку	Остеоартроз + аспірат жирової тканини
Активність лейкоцитарної еластази, нмоль/мл×хв	0,28 ± 0,02	0,60 ± 0,04*	0,52 ± 0,13*	0,52 ± 0,07*
Активність мієлопероксидази, ΔE460/хв	0,0021 ± 0,0003	0,0057 ± 0,0004*	0,0026 ± 0,0001**	0,0017 ± 0,0001**
Церулоплазмін, мг/л	532,71 ± 14,50	769,04 ± 24,68*	642,10 ± 28,4**	580,70 ± 17,16**
Дієнові кон'югати, ум. од./мл	17,85 ± 0,55	30,29 ± 1,44*	22,67 ± 1,45	19,75 ± 2,14
ТБК-активні продукти, ум. од./мл	33,23 ± 2,02	69,04 ± 1,98*	56,40 ± 3,69*,**	47,15 ± 2,92*,**
Продукти вільнорадикального окислення білків, ум. од. / мл	105,40 ± 2,55	150,37 ± 3,89*	134,60 ± 5,88*	136,60 ± 4,19*,**

Продовження табл. 5.2

Показник	Контроль	Остеоартроз	Остеоартроз + концентрат аспірату кісткового мозку	Остеоартроз + аспірат жирової тканини
Активність каталази, мкат/мл за год	152,11 ± 13,92	106,10 ± 5,30*	119,32 ± 2,98	113,18 ± 4,43*
Активність СОД, од./мл за хв.	12177,7 ± 1177,6	8961,7 ± 479,9*	11926,6 ± 1042,3**	11630,7 ± 1029,6
Активність параоксонази-1, кU/л	4,27 ± 0,38	2,41 ± 0,22*	5,71 ± 1,49**	4,05 ± 1,53
Відновлений глутатіон, ммоль/л	7,79 ± 0,80	4,66 ± 0,24*	6,49 ± 0,46**	6,61 ± 0,44**

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ достовірно по відношенню до контролю;
2. ** – $p < 0,05$ по відношенню до остеоартрозу.

Таблиця 5.3

Результати кореляційного аналізу між ступенем пошкодження структур колінного суглоба і біохімічними показниками у плазмі крові у групі з остеоартрозом

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Еластаза	г-Спірмена	0,94	-0,90	-0,90
	рівень достовірності	0,007	0,04	0,01
Мієлопероксидаза	г-Спірмена	0,63	-0,70	0,60
	рівень достовірності	0,25	0,19	0,28
Дієнові кон'югати	г-Спірмена	-0,80	0,79	-0,80
	рівень достовірності	0,10	0,11	0,10
ТБК-активні продукти	г-Спірмена	0,50	-0,32	0,50
	рівень достовірності	0,39	0,60	0,39
ПВОб	г-Спірмена	0,47	0,50	-0,50
	рівень достовірності	0,21	0,39	0,19

Продовження табл. 5.3

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Каталаза	г-Спірмена	0,63	-0,60	-0,60
	рівень достовірності	0,12	0,28	0,14
СОД	г-Спірмена	0,00	0,30	0,30
	рівень достовірності	0,50	0,62	0,31
Глутатіон	г-Спірмена	0,31	-0,30	-0,30
	рівень достовірності	0,30	0,62	0,31
Церулоплазмін	г-Спірмена	0,79	-0,80	-0,80
	рівень достовірності	0,05	0,10	0,05

У групі з ЗТП встановлено статистичне зменшення активності лейкоцитарних ферментів (активність еластази характеризувалась сильною кореляцією щодо пошкодження суглобового хряща, $r = -0,95$, $p = 0,05$) і продуктів пероксидації ліпідів і білків у сироватці крові (між останніми пряма кореляція, $r = 1,00$; $p < 0,01$) (табл. 5.4). Встановлено негативну кореляцію між щільністю субхондральної кісткової тканини (11,4 %; $p < 0,05$) і церулоплазміном ($r = -1,00$, $p < 0,001$), хоча рівень останнього тільки мав тенденцію зниження. Тобто дія ЗТП характеризувалась зміною прозапального профілю біохімічних показників крові. Проте ефект ЗТП можна розглядати лише як тенденцію до затримки розвитку остеоартрозу, оскільки більшість біохімічних показників не мала достовірної кореляції щодо стану структурних утворень колінного суглобу, які були оцінені за критеріями змін суглобового хряща, субхондральної кістки, менісків і капсули суглобу. Крім того, рівень церулоплазміну залишався на підвищеному рівні, хоча статистично значуще зменшення показника було підтверджено.

У групі з аспіратом клітин кісткового мозку встановлено статистично більшу щільність субхондральної кістки порівняно з групою без застосування клітинних технологій, і ці значення корелювали з зменшенням у плазмі крові активності еластази ($r = -1,00$; $p < 0,001$), ТБК-активних продуктів (на 18,3 %, $r = -1,00$; $p < 0,001$) та дієнових кон'югатів (на 25,1 %, $r = -1,00$; $p < 0,001$) (табл. 5.5). Ці дані вказують на те, що біохімічні показники крові мали прямий зв'язок із пошкодженням струкур колінного суглобу, тому результати міжгрупової різниці (статистично значущі відмінності показників у групах з та без введення аспірату кісткового мозку) характеризувались високою достовірністю і безпосередньо пов'язані із застосуванням аспірату кісткового мозку.

Доказом цього є те, що статистично значимо була зменшена активність мієлопероксидази і результати корелювали із зменшенням у сироватці крові рівня продуктів окиснення білків ($r = -1,00$, $p < 0,01$) і зменшенням рівня

Таблиця 5.4

Результати кореляційного аналізу між ступенем пошкодження структур колінного суглоба і біохімічними показниками у плазмі крові групи з остеоартрозом та введенням ЗТП

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Еластаза	г-Спірмена	-0,90	-0,95	-0,80
	рівень достовірності	0,19	0,05	0,20
Мілопероксидаза	г-Спірмена	-0,77	-0,11	0,40
	рівень достовірності	0,23	0,89	0,60
Дієнові кон'югати	г-Спірмена	0,77	-0,63	-0,40
	рівень достовірності	0,23	0,37	0,60
ТБК-активні продукти	г-Спірмена	0,77	-0,21	-0,80
	рівень достовірності	0,11	0,79	0,20
ПВОб	г-Спірмена	0,77	-0,21	-0,80
	рівень достовірності	0,11	0,79	0,20

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Каталаза	r-Спірмена	0,77	-0,21	-0,80
	рівень достовірності	0,11	0,79	0,20
СОД	r-Спірмена	0,26	-0,74	-0,80
	рівень достовірності	0,74	0,26	0,10
Глутатіон	r-Спірмена	0,77	-0,21	-0,80
	рівень достовірності	0,23	0,79	0,10
Церулоплазмін	r-Спірмена	0,77	-0,74	-1,00
	рівень достовірності	0,23	0,26	-

Результати кореляційного аналізу між ступенем пошкодження структур колінного суглоба і біохімічними показниками у плазмі крові групи з остеоартрозом та введенням аспірату кісткового мозку

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Еластаза	г-Спірмена	0,87	-1,00	-1,00
	рівень достовірності	0,33	-	-
Мієлопероксидаза	г-Спірмена	0,87	-0,50	-0,50
	рівень достовірності	0,33	0,67	0,67
Дієнові кон'югати	г-Спірмена	0,87	-1,00	-1,00
	рівень достовірності	0,33	-	-
ТБК-активні продукти	г-Спірмена	0,87	-1,00	-1,00
	рівень достовірності	0,33	-	-
ПВОб	г-Спірмена	-0,87	0,50	0,50
	рівень достовірності	0,33	0,67	0,67

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Каталаза	г-Спірмена	0,87	-1,00	-1,00
	рівень достовірності	0,33	-	-
СОД	г-Спірмена	-0,87	0,50	0,50
	рівень достовірності	0,33	0,67	0,67
Глутатіон	г-Спірмена	0,87	-0,50	-0,50
	рівень достовірності	0,33	0,67	0,67
Церулоплазмін	г-Спірмена	0,87	-0,50	-0,50
	рівень достовірності	0,33	0,67	0,67

церулоплазміну ($r = 1,00$, $p < 0,01$), але щодо останнього не виявлено залежності з рівнем пошкодження капсули ($r = 0,86$; $P \geq 0,05$), хряща і кісткової тканини ($r = -0,50$; $P \geq 0,05$) та колінного суглобу (введення аспірату кісткового мозку достовірно пригнічувало прогресування дистрофічних змін суглобового хряща ($r = -0,50$; $P \geq 0,05$)). Ці дані вказують на те, що застосування аспірату кісткового мозку поитивно впливають на клітини хряща епіфізарної кістки, а між пошкодженням колінного суглобу і біохімічними показниками крові є пряма залежність, що можна оцінювати і прогнозувати.

У групі з аспіратом жирової тканини не виявлено змін щільності субхондральної кістки щодо групи без застосування клітинних технологій. За шкалою McIlwraith and Fitzgerald різниця також була відсутня, зміни у капсулі корелювали з пошкодженням кісткової тканини (25,3 %, $p < 0,05$, $r = 0,94$; $p = 0,02$), дієнових кон'югатів (10,6 %, $p < 0,01$, $r = 0,94$; $p = 0,07$) і продуктів перокисного окиснення білків ($r = 0,94$; $p = 0,02$) (табл. 5.6). Рівень основних біохімічних показників, які пов'язані з пошкодженням тканин, активності еластази, ТБК-активних продуктів і церулоплазміну, характеризувалися сильною кореляцією ($r = -0,94$; $p = 0,02$). При цьому не виявлено кореляції активності мієлопероксидази з жодним з оцінюваних показників. Це значить, що реакція лейкоцитів може бути пов'язана не тільки із запаленням у суглобі, але й іншими чинниками, в тому числі реакція на введення аспірату жирової тканини у колінний суглоб. Не було виявлено кореляції між усіма показниками, використовуючи критерій рангової кореляції Спірмена, однак статистично значуще покращення встановлено щодо більшості показників за непараметричним критерієм Крускала-Уоліса або одностороннього варіаційного аналізу ANOVA. Одержані результати по різних показникам є дещо «невпорядкованими», але, якщо не враховувати чинник введення клітинних суспензій, то майже усі показники корелюють між собою. Це одночасно є доказом прямої залежності між морфологічними показниками змін суглобу з біохімічними показниками при розвитку

Таблиця 5.6

Результати кореляційного аналізу між ступенем пошкодження структур колінного суглоба і біохімічними показниками у плазмі крові групи з остеоартрозом та введенням аспірату жирової тканини

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Еластаза	г-Спірмена	0,74	-0,94	-0,80
	рівень достовірності	0,26	0,02	0,20
Мілопероксидаза	г-Спірмена	0,00	0,00	-0,32
	рівень достовірності	1,00	1,00	0,68
Дієнові кон'югати	г-Спірмена	0,95	-0,74	-1,00
	рівень достовірності	0,05	0,26	-
ТБК-активні продукти	г-Спірмена	-0,74	-0,94	0,80
	рівень достовірності	0,26	0,02	0,20
ПВОб	г-Спірмена	0,94	-0,74	-0,80
	рівень достовірності	0,02	0,26	0,20

Показники		Пошкодження капсули	Пошкодження хряща	Щільність кісткової тканини
Каталаза	г-Спірмена	-0,63	0,21	0,40
	рівень достовірності	0,37	0,79	0,60
СОД	г-Спірмена	0,63	-0,21	-0,40
	рівень достовірності	0,37	0,79	0,60
Глутатіон	г-Спірмена	0,63	-0,21	-0,40
	рівень достовірності	0,37	0,79	0,60
Церулоплазмін	г-Спірмена	0,74	-0,94	-0,60
	рівень достовірності	0,26	0,02	0,40

запалення у сироватці крові у патогенезі остеоартрозу і проявом впливу клітинних суспензій на його розвиток.

Заключення до розділу 5.

За результатами біохімічних досліджень крові можна зробити наступні висновки: стан прооксидантно-антиоксидантного балансу може слугувати показником пошкодження тканин при розвитку остеоартрозу та їх запобігання (пригнічення) або відновних процесів. Збільшення продуктів окисної модифікації ліпідів і білків є наслідком деструктивних змін у тканинах колінного суглоба та після травматично-ішемічного пошкодження капсули суглоба. На наш погляд, ці зміни переважно пов'язані з пошкодженням гіалінового хряща і запальним процесом у суглобі, оскільки зростала прозапальна активність нейтрофілів крові (активність еластази і мієлопероксидази) [103], а високий рівень церулоплазміну корелював з гострою фазою запалення при остеоартриті [165, 166]. Зменшення активності СОД і каталази оцінюють як прояв виснаження ендogenous механізмів захисту та прогресуючих пошкоджень тканин [167]. У результаті цього різко зростає вміст продуктів пероксидації ліпідів та білків, які, в свою чергу, теж є цитотоксичними і впливають на прогресування дегенеративних та метаболічних змін у тканинах.

Біохімічний профіль периферійної крові тканинних і фізіологічних реакцій на введення ЗТП і клітинних аспіратів можна розділити на три групи:

- а) активність лейкоцитів – прояв запалення;
- б) рівень окисної модифікації ліпідів і білків – циркулюючі у крові продукти пошкодження;
- в) активність антиоксидантної системи – реакція тканин на введення клітинних аспіратів і відновлення клітин та структур пошкодженого суглоба.

Порівняльний аналіз дії ЗТП і клітинних аспіратів показав наступні особливості:

1) активність лейкоцитарних ферментів (**еластаза** – позитивне пригнічення після ЗТП; **мілопероксидаза** – позитивне пригнічення у трьох групах, у більшій мірі після аспіратів жирової тканини і кісткового мозку щодо ЗТП; **параоксаназа-1** – позитивне відновлення після аспірату кісткового мозку);

2) рівень продуктів пероксидації був неоднозначним (вміст **ТБК-реагуючих продуктів** і **дієнових кон'югатів** – достовірно зменшувався після ЗТП та використання клітинних аспіратів; **ПВОБ** – спостерігалось позитивне пригнічення після ЗТП і аспірату жирової тканини; ендogenous антиоксиданту **глутатіону** – виявлялось позитивне і рівнозначне відновлення у трьох групах; активність ферментів антиоксидантної системи – **СОД** – достовірно відновлення після ЗТП та обох клітинних аспіратів, **каталаза** – позитивна активація після аспірату кісткового мозку і ЗТП; **церулоплазмину** – позитивне і рівнозначне пригнічення після аспіратів жирової тканини і кісткового мозку щодо ЗТП; глутатіону – достовірно збільшення після ЗТП та обох клітинних аспіратів).

Прозапальна характеристика виявилась більш показовою за рівнем церулоплазмину і лейкоцитарної мілопероксидази. Роль церулоплазмину у запальних процесах неоднозначна, але при запаленні рівень цього білка різко зростає, тобто він оцінюється як показник гострої фази запального процесу. За власними результатами, рівень церулоплазмину корелює з пошкодженням капсули і гіалінового хряща колінного суглоба. Його вміст і активність мілопероксидази достовірно зменшились у групах після введення аспіратів клітин кісткового мозку та жирової тканини, тоді як ЗТП не спричинила такого ефекту. На основі цих показників зроблено заключення про те, що клітинні аспірати більш суттєво, ніж ЗТП, пригнічували ці ланки системної запальної реакції у суглобі.

Травматичне та запальне пошкодження тканин викликає накопичення продуктів окисної модифікації, що на біохімічному рівні пов'язано з перокисним окисненням білків і ліпідів клітин та міжклітинного простору. Введення ЗТП, клітин аспірату кісткового мозку та жирової тканини

пригнічувало ці процеси, тоді як у групі з клітинами кісткового мозку залишався підвищений рівень продуктів окисної модифікації білків. Це слід оцінювати як тканинну реакцію на введення саме аспіратів клітин, оскільки в їх об'ємі наявна певна частка пошкоджених клітин та клітинного детриту.

Система антиоксидантного захисту у більшій мірі відновилась після введення аспірату клітин кісткового мозку та ЗТП. На основі аналізу біохімічних даних зроблено висновок, що у порівняльному аспекті введення аспірату кісткового мозку більш суттєво спричиняло позитивний відновлюючий і лікувальний вплив, порівняно з іншими досліджуваними засобами

Список опублікованих праць до розділу 5:

1. Ткачук ПВ, Страфун СС, Кучменко ОБ, Савосько СІ, Гайович ІВ, Макаренко ОМ, Мхітарян ЛС, Дроботько ТФ. Оцінка впливу тромбоцитарної плазми на біохімічні показники крові в експериментальній моделі остеоартрозу колінного суглоба. Травма. 2019;20(4): 39-45. *(Особистий внесок – вивчення літератури за темою, проведення експериментів на лабораторних тваринах, підготовка статті до друку).*

2. Tkachuk P, Savosko S, Strafun S, Kuchmenko O, Makarenko O, Mkhitaryan L, Drobotko T. Correlation of blood biochemical indicators with the level of knee joint damage in the model of the posttraumatic osteoarthritis. Georgian Med News. 2020;309:135-141. *(Особистий внесок – розробка плану досліджень, статистичний аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку).*

3. Ткачук ПВ, Страфун СС. Морфологічні та біохімічні показники остеоартрозу колінного суглобу (на основі розробки експериментальної моделі). 42 Наукові Читання імені О.О. Богомольця (24 травня 2021 року, Київ). С. 18-19. *(Особистий внесок – аналіз та статистична обробка отриманих даних, оформлення тез).*

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

З аналізу літературних джерел не виникає сумнівів в актуальності дослідження патогенезу остеоартрозу та розробки нових способів лікування захворювання, що пояснюється значним поширенням і високою соціальною значимістю даної патології. Експериментальні дослідження допомагають краще і, головне, швидше дослідити характер та наслідки розвитку дегенеративних змін у тканинах суглобів та оцінити ефективність запропонованих підходів лікування. Тому розробка експериментальних моделей на сьогодні є цінним напрямком у науковій медичній сфері, зокрема, у травматології та регенеративній медицині.

У сучасній науковій літературі остеоартроз розглядається в якості гетерогенної групи захворювань різної етіології з подібними біологічними, морфологічними і клінічними проявами [28, 33, 62, 63]. Першочерговим завданням дисертаційного дослідження була розробка власної експериментальної моделі посттравматичного остеоартрозу, яка б включала успішні складові патологічного моделювання та привнесла б додаткові чинники, що дозволило б максимально наблизити морфологічну картину до клінічних випадків. На основі аналізу фахових публікацій було зроблено висновок, що загальноприйнятою світовою практикою є моделювання остеоартрозу трьома основними способами: 1) введення у суглоб екзогенних хімічних сполук (стероїдних препаратів, вітаміну А, колагенази); 2) механічне навантаження; 3) травматичне ушкодження [70, 168]. Недоліками перших двох підходів є те, що стабільність суглобу, через розвиток дистрофічних змін у суглобових поверхнях, розвивається впродовж тривалого часу і є неоднорідною, тоді як для статистичної оцінки, більшу цінність мають стандартизовані дефекти хряща. Швидким і радикальним є спосіб відтворення локального травматичного дефекту, що не призводить на початкових етапах до тотальної втрати суглобової поверхні і дозволяє відтворити однотипові дефекти

у суглобі. Такий підхід було обрано у власних дослідженнях. За основу, у розробці моделі остеартрозу, було взято перетин медіальної зв'язки, що викликає нестабільність суглобу та порушення його біомеханіки, точкове ушкодження суглобового хряща для ініціації зони розвитку дегенерації гіалінового хряща, термокоагуляцію капсули суглобу для порушення регіональної перфузії та відтворення супутньої ішемізації. Доцільність цих дій полягає у тому, що патогенез остеартрозу включає порушення регіонального кровообігу. Доказом цього є некроз кровоносних судин і хряща суглобів при перетині магістральних судин вище суглобу [169]. Саме тому доступ до суглобової поверхні великогомілкової кістки та термічне пошкодження капсули також здійснювали з медіальної сторони суглобу, тим самим створюючи додаткове патобіохімічне порушення у регіоні нестабільності суглобу.

Через 1,5 та 2,5 місяці після операції було підтверджено структурні зміни у колінному суглобі. Найбільш вагомими порушеннями були зміни щільності епіфіза великогомілкової кістки, деформація контуру суглобової поверхні, прогресуюче зменшення товщини хряща на 18,9 % і субхондральної кісткової тканини. Ці зміни вказують на розвиток дистрофічних змін у епіфізі великогомілкової кістки, що відповідає розвитку II стадії остеартрозу [170]. Подібні результати описано в інших публікаціях, але автори додатково реєстрували остеопіти, які у власних матеріалах були відсутні [171]. Було зроблено припущення, що відтерміновані зміни епіфізарного хряща суглобу не обмежуються лише зоною дефекту, вони прогресують і викликають додаткові пошкодження перифокального гіалінового хряща та субхондральної кістки. А порушена біомеханіка суглобу, як результат нестабільності, могла вплинути на стан менісків. Для підтвердження цієї гіпотези було проведено гістологічні дослідження усіх вищевказаних структурних компонентів колінного суглобу.

На макроскопічному рівні у всіх зразках пошкодженого суглобу відмічено збільшення обсягу параартикулярних тканин, набряк суглобової сумки, збільшення товщини стінки капсули суглобу, щільності кровоносних судин, рубцеві зміни навколо ділянки хірургічного доступу до суглобових

поверхонь. Гіперемію судин капсули було підтверджено на мікроскопічному рівні, а також зміни щільності судинної сітки. Спостерігали порушення гістологічної структури капсули. Стаз крові у більшій мірі був характерний для зовнішнього (фіброзного) шару капсули, тоді як у внутрішньому (синовіальному) реєстрували стаз, ангіонекроз та інфільтрацію лейкоцитами. Встановлені структурні порушення капсули підтвердили зміни регіонального кровообігу та розвиток запального процесу. Важливим висновком дослідження є прогресуюче пошкодження ворсинок синовіальної оболонки при остеоартрозі. Розвиток дистрофічних змін у стромі ворсинок, пошкодження мікросудин і запальний інфільтрат у кінцевому рахунку позначились у зменшенні щільності ворсинок, які пов'язані з процесами формування синовіальної рідини. Із результатів клінічних досліджень відомо, що при остеоартрозі відбуваються взаємозалежні порушення синтезу рідини та розвиток запальних процесів у тканинах суглобу [172]. Власні морфологічні дані дозволили зрозуміти патофізіологічний механізм розвитку цих порушень і підтвердити адекватність запропонованої експериментальної моделі.

Наступним етапом дослідження було вивчення стану менісків колінного суглобу. Макроскопічно меніски були виявлені та структурно виділені у всіх зразках. Якщо через 1,5 місяці візуально вони були не змінені, то через 2,5 місяці виявлено деформації тіла менісків та зміни щільності сполучної тканини. Остання фіксує меніск із епіфізом кістки та капсулою колінного суглобу. Як відомо, меніски відіграють критичну захисну роль для функціонування цієї структури, завдяки поглинанню ударів та розподілу навантаження. У пацієнтів середнього та старшого віку з остеоартрозом дегенеративні зміни меніска визнано ранньою стадією розвитку захворювання [61]. За результатами власних досліджень також доведено розвиток дистрофічних змін у хрящовому тілі менісків (дистрофія та редукція хондроцитів, деструкція хондромукоїду, пошкодження судин і сполучної тканини).

Головну увагу у дослідженні було зосереджено на змінах суглобової поверхні великогомілкової кістки. Макроскопічний аналіз підтвердив розвиток

явних структурних порушень у суглобовому хрящі. Основні дані про характер розвитку дистрофічних змін у гіаліновому хрящі було одержано саме завдяки застосуванню гістологічних методів. На рівні травматичного дефекту хрящова тканина тотально відсутня з «оголенням» субхондральної кістки. Гіаліновий хрящ у перифокальній ділянці через 2,5 місяці мав меншу товщину (на 43,7 %, $p < 0,05$), що пов'язано з деструктивним пошкодженням поверхневих шарів хряща. Останній на мікроскопічному рівні є дрібноклітинним і реалізує фізіологічний морфогенез суглобового хряща. З огляду на втрату цієї важливої структурно-функціональної ділянки стає зрозумілим, чому відновлення суглобового хряща є таким слабким і часто неможливим при остеоартрозі. Крім того, нами виявлено прогресуючу редукцію клітинного складу (ізогенних груп хондроцитів) і дистрофію хондромукоїду між термінами експерименту 1,5 і 2,5 місяці. Слід зазначити, що часткове збереження товщини хряща, за умов значної втрати хондроцитів, також є несприятливим морфологічним проявом структурних змін, оскільки поява безклітинних лакун не сприяє стійкості щодо механічної напруги та не має ендогенного джерела для відновлення. Тому щільність хондроцитів є важливим критерієм у оцінці трофічного впливу клітинних технологій у лікуванні остеоартрозу. У глибоких шарах хряща, а саме на межі хрящ-кістка, реєстрували появу поодиноких порожніх лакун з кровоносними судинами. В результаті цього відмічено зміну контуру субхондральної кісткової тканини, зменшення її щільності та редукцію тканини. Ці зміни супроводжувались запальною інфільтрацією, пошкодженням епіфізарного червоного кісткового мозку та втратою гемопоетичних острівців. Останнє можна розглядати як один із чинників ризику розвитку остеопорозу. Судинна інвазія некальцифікованого хряща є характерним гістологічним проявом остеоартрозу, і з часом змінюється кальцифікацією хряща або появою остеофітів у сполучних тканинах суглобу [173, 174]. У власних експериментах зміни у глибоких шарах хряща та субхондральній кістковій тканині були пов'язані з деструктивними процесами і запаленням. При цьому у лакунах між кістковими трабекулами встановлено втрату гемопоетичних острівців

кісткового мозку, значну лейкоцитарну інфільтрацію. Зроблено заключення, що етіопатогенез остеоартрозу колінного суглобу включає ряд послідовних і взаємозалежних процесів: дегенеративні зміни суглобового хряща, які прогресують у субхондральну зону кістки, редукція червоного кісткового мозку, пошкодження менісків суглобу, фіброзні, запальні і дистрофічні процеси у капсулі суглобу. Виявлені зміни є безпосереднім наслідком посттравматичного дефекту та ускладнені нестабільністю суглобу. Розвиток змін менісків суглобу пояснюється нестабільністю, зміненою біомеханікою суглобу, порушенням гемодинаміки та мікроциркуляції.

Раніше передбачалось, що стовбурові клітини з субхондрального кісткового мозку можуть мігрувати у ділянку пошкодження та стимулювати відновлення хрящової тканини. Проте ін'єкція мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо не відновлювала суглобовий хрящ, а сприяла відновленню тільки інших тканин суглобу. Дослідники дійшли висновку, що така дія реалізується через паракринну секрецію трофічних чинників, що індукуює репаративну регенерацію на рівні ангиогенезу та розвитку сполучної тканини [175]. Одержані результати у власних експериментах вказують на те, що розвиток II стадії остеоартрозу характеризується пошкодженням кісткового мозку, втратою гемопоетичних острівців, тобто ендogenous джерела стовбурових клітин. Тому можна передбачати втрату ендogenous ресурсу регенерації у пошкоджених остеоартрозом і остеопорозом кістках колінного суглобу. Відповідно до цього додаткове введення аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин, які одержано з аутологічного кісткового мозку, може бути стратегічним напрямком у підтримці тканин суглобу.

Враховуючи досвід інших авторів та власні результати досліджень, наступним етапом дисертаційної роботи було вивчення впливу аспіратів кісткового мозку, жирової тканини і ЗТП на відновні процеси у колінному суглобі. Як вже зазначалось, основна дія цих клітинних аспіратів реалізується через паракринну стимуляцію пошкоджених тканин до відновлення. Так, тромбоцити містять значну кількість цитокінів, хемокінів та чинників росту, які

виділяються при їх пошкодженні, взаємодіють з клітинами та молекулами позаклітинного матриксу. Далі це викликає вазогенну дію, імунні реакції, ангиогенез та регенерацію тканин. У клінічній практиці почали використовувати коцентрат тромбоцитів і навіть похідні тромбоцитів [176].

Більш новим підходом регенеративного лікування остеоартрозу стала ін'єкція концентрату клітин, які одержані з аспірату кісткового мозку. Ця клітинна суспензія містить багато типів клітин та чинників, а саме цитокіни, чинники росту та гемопоетичні стовбурові клітини, але найбільший вміст цих молекул містять мезенхімальні стовбурові клітини та тромбоцити. Так, після чотирьох введень концентрату кісткового мозку зменшувався біль та зростали функціональні показники у пацієнтів [177]. Альтернативним джерелом стовбурових клітин є також жирова тканина. Крім того, стовбурові клітини з жирової тканини мають більший потенціал до морфогенезу хрящової тканини, порівняно з клітинами, які були виділені з кісткового мозку [178, 179]. Тому важливим завданням роботи було порівняти впливи цих трьох клітинних аспіратів на відновні процеси у суглобі. Для цього тваринам, через 1,5 місяці після моделювання остеоартрозу, окремо вводили у колінний суглоб 0,5 мл концентрату ЗТП, 1 мл аспірату кісткового мозку і 1 мл гомогенізованої жирової тканини. Алгоритм досліджень був аналогічний, як було описано для групи з остеоартрозом.

На основі комплексного аналізу були зроблені наступні заключення. По-перше, застосування клітинних аспіратів сприяло збереженню структурної цілісності синовіальної оболонки капсули суглобу. На морфологічному рівні це проявлялось у збільшенні щільності і довжини ворсинок, збереженні синовіальної мембрани, яка побудована з синовіоцитів, збереженні стромальних елементів ворсинок із мікросудинами. Це вказує на трофічну підтримку клітин синовіальної оболонки застосованими клітинними аспіратами. При цьому, між дослідними групами виявлено деякі цікаві відмінності. Так, після введення аспіратів кісткового мозку та жирової тканини, виявлено клітинну інтеграцію у стінку синовіальної оболонки, а саме: появи

ретикулярної тканини у першому випадку та осередків адипоцитів у другому. У порівняльному аспекті тканинні реакції у більшій мірі розвивалися після введення аспірату кісткового мозку. Встановлено розвиток ретикулярної тканини, її інтеграція з синовіальною мембраною та сполучною тканиною менісків, активація ангиогенезу. Клітини жирової тканини також інтегрувались у синовіальну оболонку і викликали формування додаткового внутрішнього прошарку сполучної тканини капсули суглобу. Після ЗТП жодних проявів тканинної реорганізації та морфогенезу тканин не встановлено. Ці результати переконливо свідчать про життєздатність введених клітинних суспензій впродовж 1 місяця розвитку остеоартрозу, їх міграцію, проліферацію та формування міжклітинних взаємодій з клітинами синовіальної мембрани та сполучної тканини капсули. Описані зміни оцінено як прояв репаративної регенерації. При цьому, після введення ЗТП вільних тромбоцитів, їх коагулянтів, або будь-яких проявів морфогенезу додаткових тканин не встановлено. Це можна пояснити швидкою деструкцією і коротким терміном існування тромбоцитів. Порівняльний аналіз виявлених структурних перебудов синовіальної оболонки вказує на більш сприятливу потенційну дію аспіратів кісткового мозку і жирової тканини, порівняно з концентратом ЗТП.

По-друге, морфологічна будова тіла менісків краще зберігалась після застосування клітинних аспіратів. Зроблено висновок, що пошкодження менісків після моделювання остеоартрозу також є прогресуючим процесом і наслідком нестабільності суглобу. Дистрофічні зміни менісків погіршують біомеханічне навантаження на колінний суглоб дослідних тварин. Тому ці структурні утворення також потребують відповідної трофічної підтримки. На жаль, морфологічна будова менісків має обмежені можливості для морфометричного та статистичного досліджень, тому головні висновки були зроблені тільки на основі аналізу гістологічних змін. Основні структурні пошкодження полягають у редукції хондроцитів у хрящовій тканині меніска і втраті сполучної тканини. У порівняльному аспекті проявом підтримуючої дії клітин кісткового мозку та жирової тканини було збільшення щільності

хондроцитів у тілах менісків, збереження охрястя і сполучної тканини. Морфогенез ретикулярної тканини, яка поєднувалась з синовіальною оболонкою, встановлено у групі з аспіратом кісткового мозку, і окремі адипоцити у сполучній тканині меніска після введення жирової тканини. Реакції, які пов'язані з розвитком ретикулярної тканини у синовіальній оболонці і сполучній тканині меніска, після введення аспірату кісткової тканини були більш вираженими, ніж інтеграція адипоцитів у синовіальну оболонку. Тобто дія клітин аспірату кісткового мозку характеризувалась більшим потенціуючим впливом на регенерацію сполучної тканини меніска і синовіальну оболонку, ніж клітини жирової тканини, а ЗТП взагалі не мала такого ефекту.

По-третє, дегенеративні зміни суглобового хряща є прогресуючими, характеризуються дистрофією клітин хрящової тканини (хондроцитів, які локалізовані у вигляді ізогенних груп клітин-клонів) і матриксу хряща (хондромукоїду), у більшій мірі пошкодженням поверхневих шарів і низьким потенціалом до відновлення. Апробована у власних дослідженнях модель остеоартрозу характеризується розвитком усіх зазначених структурних проявів і є альтернативою інших моделей, таких як перетин зв'язок суглобу, введення вітаміну А, колагенази, стероїдних гормонів, папаїну та інших (див. табл. 1.1) [180, 181, 182]. За результатами гістологічних та морфометричних досліджень нами не виявлено вираженого відновлення хрящової тканини, тільки незначне збільшення збережених хондроцитів може вказувати на тенденцію впливу клітинних аспіратів щодо пригнічення дистрофічних змін, як це показано іншими авторами [183]. Одночасно з цим, зменшення деструктивних змін у субхондральній кістковій тканині було відмічено при застосуванні ЗТП і аспірату кісткової тканини (відносна щільність кісткової тканини на 11,7 % і 15,6 %, $p < 0,05$). Після введення жирової тканини достовірно позитивної дії не встановлено, що було пов'язано з розвитком запалення у епіфізарній кістковій тканині. Зроблено заключення про потенційну захисну дію ЗТП і аспірату кісткового мозку щодо розвитку

деструктивних змін і резорбції кісткових трабекул у епіфізі кістки колінного суглобу.

По-четверте, трофічна підтримка тканин колінного суглобу на тлі введення клітинних аспіратів сприяла активації відновних процесів та пригнічувала розвиток запалення. Доказом цього є результати біохімічних досліджень. При нестабільності суглобу, термокоагуляції капсули і травматичному пошкодженні, у тканинах суглобу розвиваються патобіохімічні реакції, у результаті змінення окисно-відновного балансу у бік гіперпродуктів вільних радикалів та окисної модифікації молекул клітин. Виявлено різке зростання продуктів окиснення ліпідів і білків у плазмі крові, що пояснюється їх потраплянням у периферійну кров з пошкоджених тканин. Негативна дія продуктів пероксидації (дієнові кон'югати, окиснені протеїни, ТБК-реактивні продукти, в тому числі малоновий діальдегід) пояснюється їх цитотоксичністю, тому надмірна їх продукція корелює з прогресуючим пошкодженням тканин суглобу. При цьому відбувається пошкодження ендогенних антиоксидантних механізмів боротьби з окиснювальним стресом. Так, у експериментах виявлено зниження активності каталази, СОД, параоксонази-1, що є проявом часткового виснаження антиоксидантної системи при розвитку запальної реакції. А показниками запальної реакції, які характеризувались сильною кореляцією з пошкодженням гіалінового хряща і капсули суглобу, були: збільшений рівень церулоплазміну, підвищена активність лейкоцитарної еластази та мієлопероксидази. Зниження показників, які свідчать про запалення, після введення ЗТП, аспіратів кісткового мозку і жирової тканини є доказом пригнічення запального процесу і зменшення виходу у периферійну кров продуктів розпаду і реакції лейкоцитів периферійної крові. Статистично значуще зниження рівня продуктів окисної модифікації встановлено у всіх трьох групах без достовірної різниці між групами порівняння. Незначне підвищення ТБК-реагуючих продуктів, після введення клітинн кісткового мозку та жирової тканини, є тканинною реакцією на їх введення, оскільки в їх об'ємі наявна певна частка пошкоджених клітин і клітинного детриту. Також

виявлено часткове відновлення антиоксидантної системи за показниками вільного глутатіону, каталази, СОД, параоксонази-1, у більшій мірі на тлі введення аспірату кісткового мозку. При цьому активність параоксонази-1 у групі з аспіратом кісткового мозку мала тенденцію до перевищення контрольних значень, що може бути компенсаторною (реактивною) реакцією тканин суглобу. Найбільш значуще пригнічення прозапальної реакції (за рівнем церулоплазміну і мієлопероксидази) встановлено після введення аспірату кісткового мозку.

Як заключення, найбільш значущими результатами щодо дії клітинних суспензій можна вважати ті, що одержані у групі з аспіратом кісткового мозку. Обговорення щодо специфічної дії ЗТП, аспіратів кісткового мозку або жирової тканини, а саме виділення чинників росту, є спекулятивними, оскільки немає жодного підтвердження того, які саме клітини виділяють конкретні чинники росту. У нашій роботі це взагалі не було метою дослідження. Найбільш вагома участь введених клітин кісткового мозку та жирової тканини позначилась на активації регенерації сполучної тканини меніска суглобу та інтеграції ретикулярної тканини, адипоцитів із капсулою меніска і синовіальною оболонкою капсули. Ці наслідки є доказом виживання введених клітин у пошкоджений суглоб, активації відновних процесів у капсулі та меніску під дією клітин кісткового мозку і жирової тканини. Водночас значущих морфологічних доказів регенерації суглобового хряща не встановлено. Це ще раз підтверджує недостатній потенціал до відновлення суглобового хряща і тому лікування має бути спрямоване на попередження прогресії альтерації хряща та пошкодження кісткової тканини. У цьому напрямку клітини аспірату кісткового мозку мають кращий потенціал і переваги над ЗТП та клітинами жирової тканини.

Таким чином, одержані власні результати суттєво розширюють уявлення про можливість застосування клітинних аспіратів і значно доповнюють вже опукліковані дані мета-аналізи. Також вони являються суттєвою новизною проведеної наукової роботи [184, 185]. На основі отриманих результатів

експериментальних досліджень можна стверджувати, що клітинні аспірати і, в першу чергу, клітини – похідні кісткового мозку, є перспективним напрямком у лікуванні остеоартрозу. Дія цих введених клітин полягає у трофічній підтримці тканин суглобу, у більшій мірі – капсули і менісків, тобто здійснює оптимізуючий вплив щодо відновних процесів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено вплив клітинних аспіратів різних тканин на розвиток структурних порушень у колінному суглобі та біохімічних змін у крові, на тлі розвитку експериментального деформуючого остеоартрозу.

1. На основі аналізу патогенезу дегенеративних захворювань колінного суглобу, розроблено експериментальну модель післятравматичного деформуючого остеоартрозу. Вона полягає у відтворенні локального механічного дефекту: перетину медіальної зв'язки і термокоагуляції кровоносних судин капсули суглобу. Комплексний вплив цих чинників призводить до нестабільності суглобу, змін біомеханіки, розвитку запальної реакції з ішемізацією параартикулярних тканин. Спостерігався прогресуючий розвиток дегенеративних змін суглобової поверхні та менісків. Ця морфологічна картина відповідає II стадії захворювання остеоартрозу.

2. При моделюванні остеоартрозу колінного суглобу в експерименті у термін від 1,5 до 2,5 місяців розвиваються фіброзні зміни у зовнішньому шарі капсули з пошкодженням судин. Дистрофічні зміни проявляються у порушенні структури синовіальної оболонки з редукцією клітин синовіальної мембрани і мікросудин у ворсинках.

3. При моделюванні остеоартрозу спостерігали прогресуюче пошкодження менісків і зменшення товщини перифокального гіалінового хряща на 43,7 %. У термін 1,5 місяці структурними ознаками пошкодження меніска є набряк клітинних лакун хрящового тіла меніска. У термін 2,5 місяці спостерігали загибель хондроцитів і редукцію щільності ізогенних груп клітин у хондромукоїді з появою безклітинних лакун у тілі меніска, збільшення щільності сполучної тканини меніска, редукцію хондроцитів епіфізарного хряща та резорбцію субхондральної кісткової тканини і кісткового мозку.

4. Дія аспірату кісткового мозку та жирової тканини полягає у інтеграції введених клітин із синовіальною оболонкою та сполучною тканиною менісків, що вказує на життєздатність клітин аспіратів впродовж 1 місяця на тлі розвитку патологічного процесу та їх, ймовірно, паракринну участь у процесах

ремоделювання та регенерації пошкоджених тканин. У порівняльному аспекті тканинні реакції були більш вираженими після введення аспірату кісткового мозку, ніж жирової тканини. Вони полягали у морфогенезі ретикулярної тканини і додатково ангиогенезу. Збагачена тромбоцитами плазма у синовіальній оболонці та менісках не викликала додаткового розвитку тканин.

5. Дія збагаченої тромбоцитами плазми, клітин кісткового мозку та жирової тканини щодо гіалінового хряща великогомілкової кістки на моделі післятравматичного остеоартрозу була неспецифічною. Після введення збагаченої тромбоцитами плазми встановлено статистично більшу товщину суглобового хряща на 18,2 %, що пов'язано з кращим збереженням хондромукоїду, без вираженого збереження ізогенних груп хондроцитів у перифокальному хрящі. Після введення клітин кісткового мозку та жирової тканини не виявлено достовірної затримки деструкції гіалінового хряща (редукція товщини перифокального хряща на 54,1 % після введення аспірату кісткового мозку і 48,5 % – жирової тканини), незважаючи на часткове збереження хондроцитів у глибоких шарах хрящової тканини.

6. Дія збагаченої тромбоцитами плазми і аспірату кісткового мозку позначилась у пригніченні пошкодження субепіфізарної кісткової тканини на 17,8 % і 23,6 %, тоді як введення жирової тканини не мало позитивного впливу та було пов'язане з розвитком запальної реакції на введений аспірат жирової тканини.

7. При відтворенні остеоартрозу колінного суглобу в плазмі крові спостерігався високий рівень церулоплазміну, активності лейкоцитарної еластази і мієлопероксидази (збільшення на 44,3 %, 214,2 % і 271,4 % відповідно). Ці дані свідчать про розвиток запалення, зниження активності антиоксидантної системи при рості продуктів окисної модифікації ліпідів та білків. Це виникає внаслідок окисного стресу на тлі ішемічних, дегенеративних, травматичних і запальних змін із одночасним виснаженням антиоксидантної системи ендogenous захисту. Встановлено сильний кореляційний зв'язок біохімічних показників запалення з пошкодженням структурних утворень

колінного суглобу.

8. Після введення клітинних аспіратів зменшився рівень прозапальної активності лейкоцитів периферійної крові. У порівняльному аспекті дія усіх трьох клітинних аспіратів позначилась на зменшенні активності мієлопероксидази, а при введенні збагаченої тромбоцитами плазми, додатково й еластази. Після застосування аспірату кісткового мозку та клітин жирової тканини достовірно зменшився рівень церулоплазмину (зменшення на 13,3 % і 16,5 %), тоді як використання збагаченої тромбоцитами плазми не мало такого ефекту.

9. Після введення збагаченої тромбоцитами плазми і аспірату жирової тканини зменшилась окисна модифікація ліпідів і білків. При застосуванні аспірату кісткового мозку спостерігали аналогічну дію, за винятком вмісту ТБК-реагуючих продуктів.

10. Відновлення антиоксидантної системи, шляхом активації каталази і СОД, у більшій мірі відбувається після введення аспірату клітин кісткового мозку, у меншій мірі – жирової тканини (каталази на 18,9 %, 12,4 % і 6,7 %; СОД на 33,4 %, 33,1 % і 29,7 % відповідно), а після введення збагаченої тромбоцитами плазми – тільки неферментативної ланки, пов'язаної з глутатионом (на 47,8 %, 39,3 %, 41,8 % відповідно). Клітинні аспірати оптимізують відновлення метаболічних процесів у тканинах суглобу. Це, з високою достовірністю і рівнем кореляції, відображається у біохімічних показниках периферійної крові тварин, що є проявом трофічної та регенеративної дії досліджуваних засобів, але у більшій мірі ці дії проявляються саме при введенні аспірату кісткового мозку.

11. Як показали результати досліджень, використання збагаченої тромбоцитами плазми, аспіратів кісткового мозку і жирової тканини, не тільки сповільнює дегенеративно-дистрофічні процеси в тканинах колінного суглобу при моделюванні остеоартрозу, але й має регенеративний та трофічний ефект.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розробка моделі експериментального остеоартрозу є важливим кроком для прогресу розвитку в ортопедії та травматології. З однієї сторони, мова йде про поглиблене вивчення патогенезу остеоартрозу, розвитку структурно-функціональних змін у тканинах ушкодженого суглобу, дослідження процесів прогресування та регресування цих порушень протягом тривалого часу. З іншої сторони, це дає можливість вивчити метаболічні порушення, що розвиваються в тканинах суглобу при моделюванні остеоартрозу та в процесі їх експериментальної терапії. І нарешті, розробка моделі остеоартрозу необхідна для вивчення інноваційних засобів і технологій лікування відповідної патології у пацієнтів.
2. Проведені дослідження показали, що в результаті розвитку запропонованої експериментальної моделі патологічний процес виникає та поглиблюється у різних тканинах колінного суглобу.
3. Доведено, що при розвитку даного процесу в реакцію залучається не лише суглобовий хрящ, меніски, синовіальна оболонка, але і субхондральна кістка.
4. Виявлені порушення призводять не лише до розвитку дисфункції суглобу, але й до суттєвих змін кісткового гомеостазу. Це необхідно враховувати при лікуванні пацієнтів з хронічним остеоартрозом.
5. Результати виконаної роботи дозволили проаналізувати терапевтичну ефективність аспіратів різних аутологічних тканин організму та можливість їх використання для терапії остеоартрозу. Було встановлено, що застосування саме аспірату стовбурових клітин кісткового мозку виявилось найбільш перспективним і дієвим у плані лікування остеоартрозу у дослідних тварин.
6. Вдалося продемонструвати особливості приживлення трансплантованих у суглоб аутологічних клітин у різних його тканинах і компартментах. Це дає суттєві перспективи для клінічного використання запропонованих аспіратів різних тканин для лікування остеоартрозу та профілактики рецидиву цього захворювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mora JC, Przkora R, Cruz-Almeida Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *J Pain Res.* 2018;11:2189-2196.
2. Maetzel A, Li LC, Pencharz J, Tomlinson G, Bombardier C. Community Hypertension and Arthritis Project Study Team. The economic burden associated with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and hypertension: a comparative study. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(4):395-401.
3. Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2021 Jan;17(1):47-57.
4. Wood MJ, Miller RE, Malfait AM. The Genesis of Pain in Osteoarthritis: Inflammation as a Mediator of Osteoarthritis Pain. *Clin Geriatr Med.* 2022 May;38(2):221-238.
5. Cheung EC, DiLallo M, Feeley BT, Lansdown DA. Osteoarthritis and ACL Reconstruction-Myths and Risks. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2020 Feb;13(1):115-122.
6. Wen C, Lu WW, Chiu KY. Importance of subchondral bone in the pathogenesis and management of osteoarthritis from bench to bed. *Journal of Orthopaedic Translation.* 2014;2(1):16-25.
7. Zhang C, Li Y, Cornelia R, Swisher S, Kim H. Regulation of VEGF expression by HIF-1 α in the femoral head cartilage following ischemia osteonecrosis. *Sci Rep.* 2012;2:650.
8. Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, et al. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 26;22(17):9208.
9. Carlson CS, Meuten DJ, Richardson DC. Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res.* 1991;9(3):317-329.

10. Lykissas MG, Gelalis ID, Kostas-Agnantis IP, Vozonelos G, Korompilias AV. The role of hypercoagulability in the development of osteonecrosis of the femoral head. *Orthop Rev (Pavia)*. 2012;4(2):e17.
11. Dailiana ZH, Stefanou N, Varitimids S, Rigopoulos N, Dimitroulias A, Karachalios T, et al. Factors predisposing to thrombosis after major joint arthroplasty. *World J Orthop*. 2020 Sep 18;11(9):400-410.
12. Newberry SJ, FitzGerald J, SooHoo NF, Booth M, Marks J, Motala A, et al. Treatment of Osteoarthritis of the Knee: An Update Review [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2017 May. Report No.: 17-EHC011-EF.
13. Peláez P, Damiá E, Torres-Torrillas M, Chicharro D, Cuervo B, Miguel L, et al. Cell and Cell Free Therapies in Osteoarthritis. *Biomedicines*. 2021 Nov 19;9(11):1726.
14. Pintore A, Notarfrancesco D, Zara A, Oliviero A, Migliorini F, Oliva F, et al. Intra-articular injection of bone marrow aspirate concentrate (BMAC) or adipose-derived stem cells (ADSCs) for knee osteoarthritis: a prospective comparative clinical trial. *J Orthop Surg Res*. 2023 May 11;18(1):350.
15. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012;28(7):998-1009.
16. Shahid M, Kundra R. Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders. *EFORT Open Rev*. 2017;2(1):28-34.
17. Sánchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Prado R, Orive G, et al. Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2017;17(2):197-212.
18. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-228.
19. Чернищенко В, Штайнберг К, Луговська Н, Рижикова М, Платонова Т, Корольова Д, та ін. Приготування висококонцентрованої аутологічної плазми крові, збагаченої тромбоцитами, для біомедичного використання. *Укр. біохім. журн*. 2019;91(2):19-27.

20. Gato-Calvo L, Magalhaes J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ, Burguera EF. Platelet-rich plasma in osteoarthritis treatment: review of current evidence. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019 Feb 19;10:2040622319825567.
21. Christin IS, Muthukannan H, Karuppanan S, Chhajed SS, Suggu SR, Moitra S. Clinical use of Plasma Protein from Platelet in Degenerative Joint Disease: A Prospective Study. *J Orthop Case Rep*. 2022 Nov;12(11):105-109.
22. Themistocleous GS, Chloros GD, Kyranzoulis IM, Georgokostas IA, Themistocleous MS, Papagelopoulos PJ, et al. Effectiveness of a single intra-articular bone marrow aspirate concentrate (BMAC) injection in patients with grade 3 and 4 knee osteoarthritis. *Heliyon*. 2018 Oct 18;4(10):e00871.
23. Jevotovsky DS, Alfonso AR, Einhorn TA, Chiu ES. Osteoarthritis and stem cell therapy in humans: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26:711-729.
24. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022 Feb;30(2):184-195.
25. Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 Mar;30(2):160-167.
26. Veronese N, Cooper C, Reginster JY, Hochberg M, Branco J, Bruyère O, et al. Type 2 diabetes mellitus and osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2019 Aug;49(1):9-19.
27. Whittaker JL, Losciale JM, Juhl CB, Thorlund JB, Lundberg M, Truong LK, et al. Risk factors for knee osteoarthritis after traumatic knee injury: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and cohort studies for the OPTIKNEE Consensus. *Br J Sports Med*. 2022 Dec;56(24):1406-1421.
28. Zhang Y, Li S, Jin P, Shang T, Sun R, Lu L, et al. Dual functions of microRNA-17 in maintaining cartilage homeostasis and protection against osteoarthritis. *Nat Commun*. 2022 May 4;13(1):2447.
29. Hwang CT, Halper J. Proteoglycans and Diseases of Soft Tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1348:127-138.

30. Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y. Визначення ролі запальних та анаболічних цитокінів у метаболізмі хряща. *Ann Rheum Dis*. 2008 Dec;67 Suppl 3(0 3):iii75-82.
31. Mehana EE, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sci*. 2019 Oct 1;234:116786.
32. Zhai G. Clinical relevance of biochemical and metabolic changes in osteoarthritis. *Adv Clin Chem*. 2021;101:95-120.
33. Felson DT. Arthroscopy as a treatment for knee osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(1):47-50.
34. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26035-26054.
35. Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells*. 2020 Feb 29;43(2):168-175.
36. Park NR, Lim KE, Han MS, Che X, Park CY, Kim JE, et al. Core Binding Factor β Plays a Critical Role During Chondrocyte Differentiation. *J Cell Physiol*. 2016 Jan;231(1):162-71.
37. Fernandes TL, Gomoll AH, Lattermann C, Hernandez AJ, Bueno DF, Amano MT. Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration. *Front Immunol*. 2020 Feb 11;11:111.
38. Duan R, Xie H, Liu ZZ. The Role of Autophagy in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 25;8:608388.
39. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2619.
40. Duan R, Xie H, Liu ZZ. The Role of Autophagy in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 25;8:608388.
41. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nat Rev Rheumatol*. 2022 May;18(5):258-275.
42. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):553-565.

43. Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*. 2012;51(2):241-248.
44. Lane RS, Fu Y, Matsuzaki S, Kinter M, Humphries KM, Griffin TM. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):54.
45. Mobasheri A, Matta C, Zákány R, Musumeci G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas*. 2015;80(3):237-244.
46. Motta F, Barone E, Sica A, Selmi C. Inflammaging and Osteoarthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023 Apr;64(2):222-238.
47. Chen D, Kim DJ, Shen J, Zou Z, O'Keefe RJ. Runx2 plays a central role in Osteoarthritis development. *J Orthop Translat*. 2019 Dec 23;23:132-139.
48. Chen D, Shen J, Zhao W, Wang T, Han L, Hamilton JL, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res*. 2017 Jan 17;5:16044.
49. Nettelbladt E, Sundblad L. Protein patterns in synovial fluid and serum in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1959;2(2):144-151.
50. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(12):870-875.
51. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1997;24(2):365-371.
52. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*. 2016 Apr;85:81-90.
53. Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, et al. Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. *Arthritis Rheum*. 1997 Apr;40(4):723-7.

54. Wood MJ, Miller RE, Malfait AM. The Genesis of Pain in Osteoarthritis: Inflammation as a Mediator of Osteoarthritis Pain. *Clin Geriatr Med.* 2022 May;38(2):221-238.
55. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Aug;48(8):2173-7.
56. Li L, Li Z, Li Y, Hu X, Zhang Y, Fan P. Profiling of inflammatory mediators in the synovial fluid related to pain in knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020 Feb 14;21(1):99.
57. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA.* 2021 Feb 9;325(6):568-578.
58. Weber A, Chan PMB, Wen C. Do immune cells lead the way in subchondral bone disturbance in osteoarthritis? *Prog Biophys Mol Biol.* 2019 Nov;148:21-31.
59. Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:2318-2326.
60. Varady NH, Grodzinsky AJ. Osteoarthritis year in review 2015: mechanics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 Jan;24(1):27-35.
61. Kumar D, Souza RB, Subburaj K, MacLeod TD, Singh J, Calixto NE, et al. Are There Sex Differences in Knee Cartilage Composition and Walking Mechanics in Healthy and Osteoarthritis Populations? *Clin Orthop Relat Res.* 2015 Aug;473(8):2548-58.
62. Appleton CT, Pitelka V, Henry J, Beier F. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1854-1868.
63. van Dijk GM, Veenhof C, Lankhorst GJ, Dekker J. Limitations in activities in patients with osteoarthritis of the hip or knee: the relationship with body functions, comorbidity and cognitive functioning. *Disabil Rehabil.* 2009;31(20):1685-1691.
64. Bendele AM, Hulman JF. Effects of body weight restriction on the development and progression of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 1991;34(9):1180-1184.

65. Wei L, Hjerpe A, Brismar BH, Svensson O. Effect of load on articular cartilage matrix and the development of guinea-pig osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(5):447-453.
66. Kawaguchi H. Mechanism underlying osteoarthritis induced by mechanical stress on joint cartilage. *Clin Calcium*. 2008;18(9):1278-1286.
67. Gomez-Camarillo MA, Almonte-Becerril M, Vasquez Tort M, Tapia-Ramirez J, Kouri Flores JB. Chondrocyte proliferation in a new culture system. *Cell Prolif*. 2009 Apr;42(2):207-18.
68. Englund M. The role of biomechanics in the initiation and progression of OA of the knee. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(1):39-46.
69. Stone S, Malanga GA, Capella T. Corticosteroids: Review of the History, the Effectiveness, and Adverse Effects in the Treatment of Joint Pain. *Pain Physician*. 2021 Jan;24(S1):S233-S246.
70. Yoo SA, Park BH, Yoon HJ, Lee JY, Song JH, Kim HA, et al. Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jul;56(7):2299-311.
71. Коваленко ВМ, Вікторов ОП, Корж МО, Дедух НВ, Лисенко ІВ. Пат. 79206 Україна, МПК⁸ G 09B23/28. Спосіб моделювання остеоартрозу з синовії. № 200510418; Заявл. 4.11.2005; Опубл. 25.05.2007; Бюл. № 7. Доступний через: <http://uapatents.com/3-79206-sposib-modelyuvannya-osteoaartrozu-z-sinovitom.html>.
72. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, Boer J, et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):2008-18.
73. Cheng NT, Guo A, Cui YP. Intra-articular injection of Torin 1 reduces degeneration of articular cartilage in a rabbit osteoarthritis model. *Bone Joint Res*. 2016;5(6):218-224.

74. Zhou F, Mei J, Han X, Li H, Yang S, Wang M, et al. Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- κ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes. *Acta Pharm Sin B*. 2019 Sep;9(5):973-985.
75. Engh GA, Chrisman OD. Experimental arthritis in rabbit knees: a study of relief of pressure on one tibial plateau in immature and mature rabbits. *Clin Orthop Relat Res*. 1977;(125):221-226.
76. Longo UG, Papalia R, De Salvatore S, Picozzi R, Sarubbi A, Denaro V. Induced Models of Osteoarthritis in Animal Models: A Systematic Review. *Biology (Basel)*. 2023 Feb 10;12(2):283.
77. Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, Thain LM, Spouge AR, Holdsworth DW. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(12):986-996.
78. Smith G Jr, Myers SL, Brandt KD, Mickler EA, Albrecht ME. Effect of intraarticular hyaluronan injection on vertical ground reaction force and progression of osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *J Rheumatol*. 2005;32(2):325-334.
79. Tiralocche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, et al. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1118-28.
80. Ozkan FU, Ozkan K, Ramadan S, Guven Z. Chondroprotective effect of N-acetylglucosamine and hyaluronate in early stages of osteoarthritis an experimental study in rabbits. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2009;67(4):352-357.
81. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH, et al. Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Jun;15(6):638-45.
82. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat

anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1193-206.

83. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(10):785-791.

84. Ehrlich MG, Mankin HJ, Jones H, Grossman A, Crispen C, Ancona D. Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model. *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57(3):392-396.

85. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol.* 2010 Feb;81(2):223-30.

86. Samvelyan HJ, Hughes D, Stevens C, Staines KA. Models of Osteoarthritis: Relevance and New Insights. *Calcif Tissue Int.* 2021 Sep;109(3):243-256.

87. Гулевський ОК, Іванов ГВ, Іванов ЄГ. Пат. 42133 Україна, МПКG09B23/00. Спосіб моделювання механічного міжвиросткового дефекту суглобового хряща. Заявл. 19.01.2009; Опубл. 25.06.2009; Бюл. № 12. Доступний через: <http://uapatents.com/2-42133-sposib-modelyuvannya-mekhanichnogo-mizhvirostkovogo-defektu-suglobnogo-khryashha.html>.

88. Тарасенко ВІ. Криовоздействие при артропластике тазобедренного сустава: автореф. дисс. канд. мед. наук. Харьков, 1989. 18 с.

89. Dai G, Wang S, Li J, Liu C, Liu Q. The validity of osteoarthritis model induced by bilateral ovariectomy in guinea pig. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2006;26(6):716-719.

90. Simjee SU, Jawed H, Quadri J, Saeed SA. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R91.

91. Cope PJ, Ourradi K, Li Y, Sharif M. Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27(2):230-239.

92. Bendele AM, White SL, Hulman JF. Osteoarthritis in guinea pigs: histopathologic and scanning electron microscopic features. *Lab Anim Sci.* 1989;39(2):115-121.
93. Bendele AM, Hulman JF. Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 1988;31(4):561-565.
94. Liu W, Burton-Wurster N, Glant TT, Tashman S, Sumner DR, Kamath RV, et al. Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels. *J Orthop Res.* 2003 Jul;21(4):730-7.
95. Uchida K, Urabe K, Naruse K, Ogawa Z, Mabuchi K, Itoman M. Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort. *Exp Anim.* 2009;58(2):181-187.
96. Helminen HJ, Kiraly K, Pelttari A, Tammi MI, Vandenberg P, Pereira R, et al. An inbred line of transgenic mice expressing an internally deleted gene for type II procollagen (COL2A1). Young mice have a variable phenotype of a chondrodysplasia and older mice have osteoarthritic changes in joints. *J Clin Invest.* 1993 Aug;92(2):582-95.
97. Glasson SS. In vivo osteoarthritis target validation utilizing genetically-modified mice. *Curr Drug Targets.* 2007;8(2):367-376.
98. Henry JL. Molecular events of chronic pain: from neuron to whole animal in an animal model of osteoarthritis. *Novartis Found Symp.* 2004;260:139-279.
99. Ji X, Nakahata A, Zhao Z, Kuroki H, Aoyama T, Ito A. A Non-Invasive Method for Generating the Cyclic Loading-Induced Intra-Articular Cartilage Lesion Model of the Rat Knee. *J Vis Exp.* 2021 Jul 5;(173):10.3791/62660.
100. Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res.* 2016;11:19.
101. Rezende MU, Hernandez AJ, Oliveira CR, Bolliger Neto R. Experimental osteoarthritis model by means of medial meniscectomy in rats and effects of diacerein administration and hyaluronic acid injection. *Sao Paulo Med J.* 2015;133(1):4-12.

102. Гайович ВВ. Комплексне ортопедичне лікування хворих з травматичними ушкодженнями периферичних нервів нижньої кінцівки (клініко-експериментальне дослідження): автореф. дис. докт. мед. наук. Київ, 2017. 39 с.
103. Ткачук ПВ, Страфун СС, Кучменко ОБ, Савосько СІ, Гайович ІВ, Макаренко ОМ, та ін. Оцінка впливу тромбоцитарної плазми на біохімічні показники крові в експериментальній моделі остеоартрозу колінного суглоба. Травма. 2019; 20(4): 39-45.
104. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. JAMA. 2021 Feb 9;325(6):568-578.
105. Oláh T, Reinhard J, Gao L, Haberkamp S, Goebel LKH, Cucchiarini M, et al. Topographic modeling of early human osteoarthritis in sheep. Sci Transl Med. 2019 Sep 4;11(508):eaax6775.
106. Kan HS, Chan PK, Chiu KY, Yan CH, Yeung SS, Ng YL, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis. Hong Kong Med J. 2019 Apr;25(2):127-133.
107. Oláh T, Reinhard J, Gao L, Haberkamp S, Goebel LKH, Cucchiarini M, et al. Topographic modeling of early human osteoarthritis in sheep. Sci Transl Med. 2019 Sep 4;11(508):eaax6775.
108. Шолохова ЛБ. Диференційний вибір медикаментозного лікування хворих на остеоартроз. Український ревматологічний журнал. 2001;3/4:72-76.
109. Martel-Pelletier J, Wildi LM, Pelletier JP. Future therapeutics for osteoarthritis. Bone. 2012;51(2):297-311.
110. Bellare N, Argekar H, Bhagwat A, Situt V, Pandita N. Glucosamine and chondroitin sulphate supplementation along with diet therapy provides better symptomatic relief in osteoarthritic patients as compared to diet therapy alone. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2014;24:215-223.
111. Hochberg MC, Martel-Pelletier J, Monfort J, Möller I, Castillo JR, Arden N, et al. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. Ann Rheum Dis. 2016;75(1):37-44.

112. Herrero-Beaumont G, Román-Blas J, Castañeda S, Largo R, Blanco FJ. Chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate does not show superiority over placebo in a randomised, double blind, placebo-controlled clinical trial in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016;24:48-49.
113. Takacs J, Krowchuk NM, Garland SJ, Carpenter MG, Hunt MA. Dynamic Balance Training Improves Physical Function in Individuals With Knee Osteoarthritis: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Arch Phys Med Rehabil*. 2017 Aug;98(8):1586-1593.
114. Lo GH, Vinod S, Richard MJ, Harkey MS, McAlindon TE, Kriska AM, et al. Association Between Walking for Exercise and Symptomatic and Structural Progression in Individuals With Knee Osteoarthritis: Data From the Osteoarthritis Initiative Cohort. *Arthritis Rheumatol*. 2022 Oct;74(10):1660-1667.
115. Lambova S. Exercise Programmes for Osteoarthritis with Different Localization. *Curr Rheumatol Rev*. 2018;14(2):123-130.
116. Chen L, Yu Y. Exercise and Osteoarthritis. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1228:219-231.
117. Bennell KL, Ahamed Y, Jull G, Bryant C, Hunt MA, Forbes AB, et al. Physical Therapist-Delivered Pain Coping Skills Training and Exercise for Knee Osteoarthritis: Randomized Controlled Trial. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(5):590-602.
118. de Rooij M, van der Leeden M, Cheung J, van der Esch M, Häkkinen A, Haverkamp D, et al. Efficacy of Tailored Exercise Therapy on Physical Functioning in Patients With Knee Osteoarthritis and Comorbidity: A Randomized Controlled Trial. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017;69(6):807-816.
119. Cheung C, Wyman JF, Bronas U, McCarthy T, Rudser K, Mathiason MA. Managing knee osteoarthritis with yoga or aerobic/strengthening exercise programs in older adults: a pilot randomized controlled trial. *Rheumatol Int*. 2017 Mar;37(3):389-398.
120. Kabiri S, Halabchi F, Angoorani H, Yekaninejad S. Comparison of three modes of aerobic exercise combined with resistance training on the pain and function of

patients with knee osteoarthritis: A randomized controlled trial. *Phys Ther Sport*. 2018 Jul;32:22-28.

121. Brosseau L, Taki J, Desjardins B, Thevenot O, Fransen M, Wells GA, et al. The Ottawa panel clinical practice guidelines for the management of knee osteoarthritis. Part three: aerobic exercise programs. *Clin Rehabil*. 2017 May;31(5):612-624.

122. Perlman A, Fogerite SG, Glass O, Bechard E, Ali A, Njike VY, et al. Efficacy and Safety of Massage for Osteoarthritis of the Knee: a Randomized Clinical Trial. *J Gen Intern Med*. 2019 Mar;34(3):379-386.

123. Lü J, Huang L, Wu X, Fu W, Liu Y. Effect of Tai Ji Quan training on self-reported sleep quality in elderly Chinese women with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Sleep Med*. 2017 May;33:70-75.

124. Veronesi F, Della Bella E, Cepollaro S, Brogini S, Martini L, Fini M. Novel therapeutic targets in osteoarthritis: Narrative review on knock-out genes involved in disease development in mouse animal models. *Cytotherapy*. 2016;18(5):593-612.

125. Moon PM, Beier F. Novel Insights into Osteoarthritis Joint Pathology from Studies in Mice. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(8):50.

126. Oliviero F, Ramonda R, Hoxha A, Scanu A, Galozzi P, Favero M, et al. Effect of an oral preparation containing hyaluronic acid, chondroitin sulfate, hydrolyzed collagen type II and hydrolyzed keratin on synovial fluid features and clinical indices in knee osteoarthritis. A pilot study. *Reumatismo*. 2020 Nov 19;72(3):125-130.

127. Alebrahim-Dehkordi E, Soveyzi F, Arian AS, Hamedanchi NF, Hasanpour-Dehkordi A, Rafieian-Kopaei M. Quercetin and Its Role in Reducing the Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Osteoarthritis. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2023;21(3):153-165.

128. Agut Sanchez J, Fernandez Navarro C, Espelleta Gil G, Junca Riuro M, Junca Busquets J, Junca Riuro F, Melendo Baños J. Patent Application, WIPO, ht tp. Composition for the improvement of functional difficulties due to articular cartilage disorders. Patent W0/2008/152015. Publ. Date 18.12.2008. Available at: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2008152015>.

129. Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E, Kitsanta P, Fotsis T, Papapetropoulos A, et al. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(6):818-823.
130. Weber AE, Bolia IK, Trasolini NA. Biological strategies for osteoarthritis: from early diagnosis to treatment. *Int Orthop.* 2021 Feb;45(2):335-344.
131. Cook CS, Smith PA. Clinical Update: Why PRP Should Be Your First Choice for Injection Therapy in Treating Osteoarthritis of the Knee. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2018 Dec;11(4):583-592.
132. Гайович ВВ. Вплив збагаченої тромбоцитами плазми на відновлення нерва і м'яза після їх травматичного ушкодження. *Український нейрохірургічний журнал.* 2014;3:79-83.
133. Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med.* 2013;41(2):356-364.
134. Simental-Mendía M, Vílchez-Cavazos JF, Peña-Martínez VM, Said-Fernández S, Lara-Arias J, Martínez-Rodríguez HG. Leukocyte-poor platelet-rich plasma is more effective than the conventional therapy with acetaminophen for the treatment of early knee osteoarthritis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2016;136(12):1723-1732.
135. Southworth TM, Naveen NB, Tauro TM, Leong NL, Cole BJ. The Use of Platelet-Rich Plasma in Symptomatic Knee Osteoarthritis. *J Knee Surg.* 2019 Jan;32(1):37-45.
136. Gobbi A, Karnatzikos G, Mahajan V, Malchira S. Platelet-rich plasma treatment in symptomatic patients with knee osteoarthritis: preliminary results in a group of active patients. *Sports Health.* 2012;4(2):162-172.
137. Acosta-Olivo C, Esponda-Colmenares F, Vilchez-Cavazos F, Lara-Arias J, Mendoza-Lemus O, Ramos-Morales T. Platelet rich plasma versus oral paracetamol for the treatment of early knee osteoarthritis. Preliminary study. *Cir Cir.* 2014;82(2):163-169.

138. Ткачук ПВ, Страфун СС, Савосько СІ, Макаренко ОМ. Спосіб моделювання хронічного остеоартрозу колінного суглоба у кролів. Патент України на корисну модель № 130791, Опубл. 26.12.2018, бюл. № 24. Доступний через: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=253962>.
139. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 2004;91(1):4-15.
140. Abegão KG, Bracale BN, Delfim IG, Santos ES, Laposy CB, Nai GA, et al. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2015;30(3):209-215.
141. Barrionuevo DV, Laposy CB, Abegão KG, Nogueira RM, Nai GA, Bracale BN, et al. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab Anim.* 2015;49(3):209-214.
142. Gaiovych I, Savosko S, Labunets I, Utko N, Makarenko A, Chaikovsky Y. Sciatic nerve regeneration after autografting and application of the bone marrow aspirate concentration. *Georgian Med News.* 2019 Oct;(295):145-152.
143. Fitzgerald J, Rich C, Burkhardt D, Allen J, Herzka AS, Little CB. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(11):1319-1326.
145. Manolescu BN, Berteanu M, Cinteza D. Effect of the nutritional supplement ALAnerv on the serum PON1 activity in postacute stroke patients. *Pharmacol. Rep.* 2013;65(3):743-750.
146. Huang J, Milton A, Arnold RD, Huang H, Smith F, Panizzi JR, et al. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *J Leukoc Biol.* 2016 Apr;99(4):541-8.
147. Кубишкін АВ, Пальона ЮВ, Фомочкіна ІІ. Спосіб визначення активності макрофагальної еластази. Патент України № 28914. Опубл. 25.12.2007, бюл. № 1. Доступний через: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=115418&chapter=biblio>.

148. Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:209-20.
149. Shangari N, O'Brien PJ. Catalase activity assays. *Curr Protoc Toxicol.* 2006 Mar;Chapter 7:Unit 7.7.1-15.
150. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med.* 1993 Oct;15(4):353-63.
151. Мецишен ІФ. Метод визначення окислювальної: модифікації білків плазми. *Буковинський медичний вісник.* 1998;2:156-158.
152. Kuzminskaia UA. Biochemical, immunological and biophysical methods in toxicological experiment. *Methodological guideline.* Kyiv: Health, 1989. P. 23-25.
153. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981;77:373-82.
154. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union Official Journal of the European Union,* L276:33-79.
155. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE, Fuller CJ, Hurtig M, Cruz A. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S93-S105.
156. Chaves HV, Ribeiro Rde A, de Souza AM, Rodrigues e Silva AA, Gomes AS, Vale ML, et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:707985.
157. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta.* 2011;1824(1):133-145.
158. Muley MM, Reid AR, Botz B, Bölcskei K, Helyes Z, McDougall JJ. Neutrophil elastase induces inflammation and pain in mouse knee joints via activation of proteinase-activated receptor-2. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):766-777.

159. Breedveld FC. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43Suppl 1:i4-8.
160. Taler-Verčič A, Goličnik M, Bavec A. The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and -3. *Molecules*. 2020 Dec 17;25(24):5980.
161. Steinbeck MJ, Nesti LJ, Sharkey PF, Parvizi J. Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *J Orthop Res*. 2007;25(9):1128-1135.
162. de Vries MA, Alipour A, Birnie E, Westzaan A, van Santen S, van der Zwan E, et al. Coronary leukocyte activation in relation to progression of coronary artery disease. *Front Med*. 2016;10(1):85-90.
163. Segelmark M, Persson B, Hellmark T, Wieslander J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? *Clin Exp Immunol*. 1997;108:167-174.
164. Conforti A, Franco L, Menegale G, Milanino R, Piemonte G, Velo GP. Serum copper and ceruloplasmin levels in rheumatoid arthritis and degenerative joint disease and their pharmacological implications. *Pharmacol Res Commun*. 1983;15(9):859-867.
165. Strecker D, Mierzecki A, Radomska K. Copper levels in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(2):312-6.
166. Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, et al. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(8):1502-1510.
167. Tikhova Y, Dvorshchenko K, Dranitsina A, Grebinyk D, Korotkyi O, Ostapchenko L. Prooxidant – antioxidant status and Ptgs2, Nos2 genes expression in rat cartilage with osteoarthritis and after the treatment of chondroitin sulfate. *RJPBCS*. 2017;8(4):994-1001.
168. Englund M, Guerhazi A, Lohmander SL. The role of the meniscus in knee osteoarthritis: a cause or consequence? *Radiol Clin North Am*. 2009;47(4):703-12.
169. Ni R, Guo XE, Yan C, Wen C. Hemodynamic stress shapes subchondral bone in osteoarthritis: An emerging hypothesis. *J Orthop Translat*. 2021 Dec30;32:85-90.

170. Otani S, Kanamoto T, Oyama S, Yamakawa S, Shi W, Miyazaki R, et al. Meniscus surface texture is associated with degenerative changes in biological and biomechanical properties. *Sci Rep*. 2022 Jul 13;12(1):11977.
171. Stok KS, Besler BA, Steiner TH, Villarreal Escudero AV, Zulliger MA, Wilke M, et al Three-Dimensional Quantitative Morphometric Analysis (QMA) for In Situ Joint and Tissue Assessment of Osteoarthritis in a Preclinical Rabbit Disease Model. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0147564.
172. McCabe PS, Parkes MJ, Maricar N, Hutchinson CE, Freemont A, O'Neill TW, et al. Brief Report: Synovial Fluid White Blood Cell Count in Knee Osteoarthritis: Association With Structural Findings and Treatment Response. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(1):103-107.
173. Qian JJ, Xu Q, Xu WM, Cai R, Huang GC. Expression of VEGF-A Signaling Pathway in Cartilage of ACLT-induced Osteoarthritis Mouse Model. *J Orthop Surg Res*. 2021 Jun 14;16(1):379.
174. Vadalà G, Russo F, Musumeci M, Giacalone A, Papalia R, Denaro V. Targeting VEGF-A in cartilage repair and regeneration: state of the art and perspectives. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018 Nov-Dec;32(6 Suppl.1):217-224.
175. De Bari C, Roelofs AJ. Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;40:74-80.
176. Gato-Calvo L, Magalhaes J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ, Burguera EF. Platelet-rich plasma in osteoarthritis treatment: review of current evidence. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019 Feb 19;10:2040622319825567.
177. Shaw B, Darrow M, Derian A. Short-Term Outcomes in Treatment of Knee Osteoarthritis With 4 Bone Marrow Concentrate Injections. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2018 Jun 18;11:1179544118781080.
178. Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Bellotti C, Illescas-Montes R, Stanco D, Arciola CR, et al. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 6;23(11):6356.

179. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016 Dec;64(6):443-454.
180. Serra CI, Soler C. Animal Models of Osteoarthritis in Small Mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2019 May;22(2):211-221.
181. Lorenz J, Grässel S. Experimental osteoarthritis models in mice. *Methods Mol Biol*. 2014;1194:401-19.
182. McCoy AM. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol*. 2015 Sep;52(5):803-18.
183. Kim JG, Rim YA, Ju JH. The Role of Transforming Growth Factor Beta in Joint Homeostasis and Cartilage Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*. 2022 Oct;28(10):570-587.
184. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(9):2459-2474.
185. Awad ME, Hussein KA, Helwa I, Abdelsamid MF, Aguilar-Perez A, Mohsen I, et al. Meta-Analysis and Evidence Base for the Efficacy of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Knee Cartilage Repair: Methodological Guidelines and Quality Assessment. *Stem Cells Int*. 2019 Apr 7;2019:3826054.
186. Коструб ОО, Поляченко ЮВ, Котик ВВ, Блонський РІ та інші. Аутологічна плазма в ортопедії та травматології. Київ 2020, с.153.
187. Засаднюк ІА. Дисертація на здобуття наукового ступеня к.м.н. «Вплив аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин на регенерацію стовбурового хряща». Київ 2009, ДУ «Інститут травматології та ортопедії» НАМН України.
188. Риган ММ. Дисертація на здобуття наукового ступеня к.м.н. «Вплив глюкокортикоїдів та антигомотоксичних препаратів на суглобовий хрящ при його механічному пошкодженні у спортсменів. Київ 2006, ДУ «Інститут травматології та ортопедії» НАМН України.