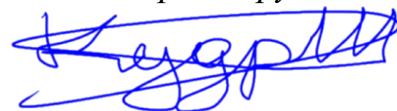


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Кудрачев Тагир Радикович

**Тканевая инженерия менисков коленного сустава с использованием
скафолдов на комбинированной основе**

3.1.8. Травматология и ортопедия

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Лычагин Алексей Владимирович

доктор химических наук, профессор

Тимашев Петр Сергеевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛЕЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕНИСКА КОЛЕННОГО СУСТАВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Структурно-функциональные особенности мениска коленного сустава	13
1.2. Биомеханическая характеристика мениска.....	14
1.3. Разрывы мениска коленного сустава	17
1.4. Лечение разрывов мениска коленного сустава.....	18
1.5. Тканеинженерный подход к созданию скаффолдов мениска коленного сустава.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1. Общий дизайн исследования.....	32
2.2. Создание и тестирование скаффолда мениска коленного сустава	34
2.2.1. Изготовление скаффолда (первый этап исследования)	34
2.2.2. Оценка физических параметров скаффолдов мениска коленного сустава...	36
2.2.3. Определение биосовместимости скаффолдов (второй этап исследования).....	39
2.3. Имплантация скаффолда лабораторным животным	41
2.3.1. Подкожная имплантация скаффолдов мениска.....	41
2.3.2. Имплантация скаффолда мениска.....	43
2.4. Статистическая обработка	53
ГЛАВА 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ СКАФФОЛДОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПАРАМЕТРОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ (ПЕРВЫЙ И ВТОРОЙ ЭТАПЫ).....	55
3.1. Изготовление скаффолдов	55
3.2. Определение гидрофильности.....	60
3.3. Определение цитотоксичности на фибробластах человека	64
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИМПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДА ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ (ТРЕТИЙ И ЧЕТВЕРТЫЙ ЭТАПЫ).....	66

4.1. Воспалительная реакция после подкожной имплантации.....	66
4.2. Результаты после имплантации в коленный сустав.....	76
4.2.1. Локальный статус и качество жизни кроликов после имплантации скаффолда.....	76
4.2.2. Исследование эксплантов после выведения животных из эксперимента.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
ВЫВОДЫ	118
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	143
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	144
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	147
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	148
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Дегенеративные изменения и острые разрывы мениска коленного сустава могут значительно ухудшить качество жизни пациента по причине боли и ограничения объема движений в нем. Разрыв мениска является наиболее распространенным видом травмы колена, при этом частота травм мениска, приводящих к менискэктомии, составляет 61 на 100 000 населения в год [115, 174]. Повреждения менисков сопровождают 55–85% всех случаев травмы коленного сустава и встречаются особенно часто в наиболее активном трудоспособном возрасте [110]. Дегенеративные разрывы мениска характерны для пациентов старшей возрастной группы. Такие разрывы не ассоциированы с острой травмой и могут провоцироваться на фоне дегенерации и ослабления прочности ткани на микроуровне и обусловлены развитием остеоартрита (ОА) [1, 43].

Независимо от этиологии, нарушение целостности менисков способствует механическому повреждению хрящевой ткани и изменению биомеханики сустава, что обуславливает необходимость в дорогостоящем хирургическом лечении (хондропластика, эндопротезирование коленного сустава) [8, 52, 163].

Выбор способа лечения конкретного случая разрыва менисков зависит от многих факторов: возраст пациента, анамнез, генез и локализация разрыва, данные клинического осмотра, результаты функциональных тестов и магнитно-резонансной томографии (МРТ) [1, 7, 45, 115].

При острых разрывах мениска на первом этапе лечения возможно применение консервативных методов при помощи физиотерапевтического лечения, лечебной физкультуры и медикаментозного лечения для снижения болевого синдрома [42].

Имеются противоречивые результаты лечения разрывов мениска у пациентов с ОА: с одной стороны, хирургическое вмешательство может эффективно устранить болевой синдром и улучшить функцию сустава, с другой — у пациентов

с выраженным ОА хирургическое лечение не только не способствует облегчению симптомов, но и может ускорить прогрессирование дегенеративных изменений. Это может объясняться сложностью идентификации источника клинических проявлений — вызваны ли они непосредственно разрывом, ОА, или их сочетанием [1, 4]. Консервативное лечение, направленное на снижение боли и воспаления, не всегда способно устранить функциональные ограничения, связанные с разрывом мениска [16, 43].

Существует несколько вариантов хирургического лечения разрывов менисков коленного сустава. Они включают полную или частичную менискэктомию, шов мениска и его реконструкцию [3]. В последнем случае для замены сегмента отсутствующего мениска используется аллографт, протез или скаффолд мениска [40].

По данным исследований, даже частичная резекция мениска ведет к нарушению нормальной архитектоники структур коленного сустава и неправильному перераспределению нагрузок, что приводит к прогрессированию остеоартроза [65, 107, 119, 178]. Восстановление мениска является приоритетной задачей в тех случаях, когда отсутствует или устранена нестабильность в коленном суставе, имеются только периферические разрывы мениска и в случаях повреждений у молодых и физически активных пациентов [31, 63, 77].

Реконструкция поврежденных менисков при помощи шва возможна только при определенной локализации разрыва. По данным мировой статистики, в 20% случаев результаты лечения пациентов после выполнения шва мениска остаются неудовлетворительными, особенно если разрывы расположены в аваскулярной зоне [35, 40, 107, 175].

Восполнение утраченной функционирующей части мениска коленного сустава возможно в том числе при использовании аллогенных трансплантатов. Однако применение данной методики ограничено по нескольким причинам: возраст до 55 лет, стабильность коленного сустава и отсутствие значительных отклонений оси конечности от нормальных значений. На конечный результат

оказывает влияние степень артроза, присутствующего до операции, и анатомия аллотрансплантата [22, 23, 82, 155, 178].

Степень разработанности темы исследования

Долгие годы проблема регенерации мениска оставалась неразрешимой, однако в последнее время появились технологии, позволяющие рассчитывать на восстановление утраченной ткани мениска [92]. Одной из таких технологий являются скаффолды менисков коленного сустава, которые представляют из себя каркасы из искусственных материалов, стимулирующих восстановление тканей и регенерацию путем рекрутирования аутологичных стромальных клеток, которые могут заполнить трехмерную архитектуру и восстановить фиброзно-хрящевую ткань [87, 166].

В клинической практике были допущены только два коммерческих менисковых скаффолда: скаффолд на коллагеновой основе CMI (Collagen Meniscal Implant) и синтетический скаффолд Actifit [87]. Важен тщательный подбор пациентов или сочетание с другими оперативными техниками для достижения оптимального лечения. Ограничениями для имплантации скаффолдов могут являться возраст, высокий индекс массы тела, нестабильность в коленном суставе, а также размеры и форма разрыва мениска [167].

Существующие скаффолды имеют ряд недостатков, включая низкую степень интеграции каркасов с капсулой сустава, риск смещения и деформации, что может привести к повторным операциям [90, 109]. В некоторых случаях происходит уменьшение формы и размеров скаффолда [126, 166], изменения первоначальных механических свойств каркасов после имплантации в течение 5 лет. В целом, существует ограниченное количество исследований, подтверждающих хондропротекторное действие менисковых каркасов Actifit и CMI [110, 150].

Исследователи и врачи заинтересованы в разработке идеальной комбинации скаффолда, биостимулирующих молекул и клеток для того, чтобы добиться лучших результатов по восстановлению менисковой ткани [113, 125]. Данные

технологии еще недостаточно проработаны, чтобы быть рекомендованными к широкому внедрению в клиническую практику. Применение аддитивных технологий как средство производства для создания сложных конструкций представляет большой интерес в травматологии и ортопедии в связи с возможной персонализацией конечного импланта [18, 28, 37, 40, 70, 103, 137, 161].

Проблема лечения повреждений менисков с помощью регенеративной медицины еще не разрешена. Скаффолд должен обеспечивать стабильную поддержку поврежденной ткани, пока она восстанавливается, а также иметь свойства, которые стимулируют клеточную адгезию, пролиферацию и ангиогенез. Следует не только учитывать сложную трехмерную структуру мениска и способствовать интеграции с окружающими тканями, но и продумать архитектуру положения всей конструкции внутри коленного сустава [96].

Цели и задачи исследования

Цель исследования: разработать в эксперименте методики замещения дефектов менисков коленного сустава с использованием скаффолдов на комбинированной основе.

Задачи:

1. Определить оптимальный материал и технику изготовления каркаса мениска для имплантации в коленный сустав.
2. Определить биосовместимость созданных скаффолдов на модели экспериментальных животных.
3. Разработать методики имплантации скаффолдов в коленный сустав мелких лабораторных животных.
4. Определить регенеративный потенциал комбинированного скаффолда мениска коленного сустава.

Научная новизна

Впервые предложена технология изготовления многокомпонентного каркаса скаффолда с контролируемыми параметрами, позволяющими имитировать нативную микроархитектуру мениска коленного сустава.

Впервые описаны преимущества короткого медиального хирургического доступа при имплантации скаффолда мениска на модели лабораторного животного породы Советская Шиншилла.

Теоретическая и практическая значимость работы

Производство скаффолдов мениска с использованием аддитивных технологий, в частности посредством 3D-принтера методом послойного наложения, демонстрирует высокий потенциал для последующего использования в травматологии и ортопедии. Разработанные экспериментальные подходы по созданию и имплантации каркасов мениска на моделях мелких животных могут послужить основой для создания тканеинженерных конструкций искусственных менисков для реконструктивной хирургии.

Методология и методы исследования

Данное исследование проводили в Клинике травматологии, ортопедии и патологии суставов Университетской клинической больницы №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на базе кафедры травматологии, ортопедии и хирургии катастроф Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, а также на базе Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в период с 2021 по 2024 года. План исследования одобрен этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени

И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (№17-23 от 05.10.2023 г.).

На первом этапе были выбраны материалы для создания скаффолдов мениска: каркас из поликапролактона с модификацией при помощи коллагеновых гидрогелей первого и второго типов, произведенных в Институте регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). На втором этапе исследования определена цитотоксичность созданного скаффолда на культуре фибробластов человека, после чего определили общую токсичность путем имплантации крысам (третий этап).

На заключительном этапе созданные конструкты имплантировали по разработанной методике на экспериментальной модели удаленного мениска у кроликов породы Советская Шиншилла в количестве 12 особей мужского пола. Всего было выполнено 24 имплантации созданных скаффолдов. Результаты прослежены через 30, 90 и 180 дней после проведенных операций с применением механических тестов, лучевых и морфо-гистологических исследований, выполненных в Институте регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Положения, выносимые на защиту

1. Предложенная конструкция комбинированного скаффолда мениска коленного сустава является биосовместимой и позволяет добиться полной регенерации ткани мениска.
2. Разработана оптимальная модель имплантации скаффолдов мениска с использованием короткого медиального хирургического доступа для испытания последующих каркасов в эксперименте на мелких лабораторных животных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертационной работы полностью соответствует паспорту научной специальности 3.1.8. Травматология и ортопедия, пункту 4 «Экспериментальная и клиническая разработка и совершенствование методов лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательной системы, их последствий, а также предупреждение, диагностика и лечение возможных осложнений» направлений исследований, и паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, пунктам 5 «Клеточные механизмы репликации и репарации», 10 «Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов» направлений исследований, 20 «Системный анализ взаимоотношений клеток в составе тканей и органов. Внутриклеточный симбиоз/паразитизм» и 22 «Разработка и применение новых экспериментальных моделей и методов гистотехнологии, культивирования клеток, цитологической диагностики, иммуноцитохимии, микроскопии, компьютерной морфометрии, цифрового анализа изображений, методов молекулярно-генетического анализа индивидуальных клеток, а также, других методов, необходимых для проведения исследований в области клеточной биологии» направлений исследований.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования определяется достаточным объемом выборки экспериментальных животных, применением современных информативных методик, выполненных с использованием сертифицированного оборудования и реактивов и включающих комплекс функциональных и биохимических методов в сочетании с морфологической верификацией процесса заселения клеточными элементами оригинальных отечественных скаффолдов. В работе использованы непараметрические методы статистической обработки в соответствии с характеристиками вариационных рядов изучаемых показателей.

Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на Втором российско-китайском симпозиуме «Ортопедия будущего: нанотехнологии и искусственный интеллект» (9 ноября 2022, г. Москва), в рамках конкурса «Биопринтинг, биофабрикация и проектная деятельность» (10 октября 2023, г. Санкт-Петербург) и на VII Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите 2023: Мегатренды в биомедицине (SIBS 2023) (9 ноября 2023, г. Москва).

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры травматологии, ортопедии и хирургии катастроф Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол №2 от 27 февраля 2025 года).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре травматологии, ортопедии и хирургии катастроф Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

В рамках проведения научно-квалифицированной работы автор провел анализ литературы, определил цель и задачи исследования, разработал дизайн исследования и принимал участие в определении технического задания к созданию скаффолда мениска. Моделирование скаффолдов мениска коленного сустава по размеру кролика с помощью компьютерной программы, печать скаффолдов на 3D-принтере биосовместимым и биоразлагаемым материалом были выполнены лично автором. Автором проведены запланированные эксперименты: имплантация скаффолдов на моделях мелких лабораторных животных, проанализированы

результаты *in vitro* и *in vivo* экспериментов, проведен анализ лабораторных данных и результатов гистологического исследования и их статистическая обработка.

Публикации и доклады о результатах исследований, а также написание диссертации и автореферата осуществлялись непосредственно автором.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 4 печатные работы, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 иная публикация.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение, четыре главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований – изготовление скаффолдов и определение их параметров в лабораторных условиях и результаты имплантации скаффолда лабораторным животным), заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы (186 источников: 49 отечественных и 137 иностранных), 5 приложений. Диссертация содержит 27 таблиц (4 таблицы в приложениях), 64 рисунка (2 рисунка в приложениях).

ГЛАВА 1. ЛЕЧЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕНИСКА КОЛЕННОГО СУСТАВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Структурно-функциональные особенности мениска коленного сустава

Мениски коленного сустава являются фиброзно-хрящевыми анатомическими структурами, каждый из которых фиксирован к плато большеберцовой кости передним и задним рогами. Помимо этого, мениски крепятся внешней стороной к капсуле сустава, а также различными связками к внутренним анатомическим структурам [108, 122]. Данная конструкция позволяет им передвигаться внутри коленного сустава и распределять цикличные нагрузки [22, 108, 181].

Содержание воды в мениске коленного сустава составляет 72% [98]. Оставшаяся сухая масса составляет экстрацеллюлярный матрикс и клетки. Различают три субпопуляции клеток мениска: фибробластоподобные клетки, находящиеся в сосудистой зоне, хондроцитоподобные клетки – в аваскулярной зоне, и клетки, распределенные в поверхностных слоях белой зоны [100]. Их общая функция – синтез и отложение внеклеточного матрикса в ответ на механические раздражители. Зональное распределение различных клеток в архитектуре мениска находится в центре внимания исследователей, так как это может помочь в создании биоинженерных имплантатов [95, 159].

Большая часть экстрацеллюлярного матрикса представлена коллагеном. W. Petersen, B. Tillmann (1998) различают три слоя коллагена в ткани мениска: поверхностная сеть фибрилл, образующая сетчатую матрицу на участках суставных поверхностей бедренной и большеберцовой кости; пластинчатый слой, лежащий ниже фибриллярной сети и состоящий из радиально ориентированных пучков коллагеновых волокон; и центральный основной слой коллагеновых фибрилл, идущий по окружности от переднего рога к заднему [143].

Коллаген, входящий в состав мениска, представлен разными типами. Во внешней трети преобладает коллаген I типа, во внутренней части мениска –

коллаген II типа. Сплетение коллагеновых волокон позволяет преобразовывать вертикальную сжимающую нагрузку в силу растяжения продольных волокон коллагена [118]. Во всех слоях мениска располагаются тонкие эластические волокна, которые, сопровождая коллагеновые волокна, образуют нежную сеть [66].

Известно, что критерием механической прочности ткани является сохранение соотношения эластических и коллагеновых волокон. Возрастные изменения структуры менисков включают уменьшение количества эластических волокон и разволокнение коллагеновых пучков. Все это приводит к снижению прочности менисков [35, 84].

Мениск можно разделить на три зоны в зависимости от кровоснабжения: красную (с достаточным кровоснабжением), розовую (переходную) и белую (аваскулярную). Внутренняя треть мениска лишена сосудов, и ее питание осуществляется за счет диффузии синовиальной жидкости. Способность к заживлению напрямую зависит от кровообращения, что делает белую зону наиболее уязвимой к травмам и дегенеративным изменениям [67, 95, 169].

1.2. Биомеханическая характеристика мениска

Определение характеристик сложного вязкоупругого механического поведения мениска *ex vivo* требует значительных экспериментальных усилий с точки зрения сбора тканей, подготовки и сохранения образцов, а также внедрения протоколов тестирования, которые, как правило, не стандартизированы [153].

Большинство исследований основано на относительно небольшом размере образцов, что свидетельствует о значительной вариабельности определенных параметров материала между образцами [153]. В дополнение к этому, асимметричная форма латерального и медиального менисков и региональные различия в микроструктуре областей переднего рога, промежуточной части и заднего рога приводят к различиям в механических свойствах внутри одного образца [35]. Действительно, сообщалось о десятикратных различиях как в модуле

упругости при растяжении, так и в равновесном модуле при сжатии ткани мениска [92, 155].

Тем не менее, согласно исследованиям, мениск способен выдержать сжимающие силы по оси с суммарным модулем упругости 100–150 кПа [108]. Модуль упругости ткани при растяжении варьируется в окружном и радиальном направлениях; он составляет приблизительно 100–300 МПа по окружности и в 10 раз ниже, чем в радиальном направлении. Модуль упругости мениска при сдвиге составляет приблизительно 120 кПа [92].

Мениск коленного сустава имеет полностью развитую геометрию, крепление и зонально-зависимую ультраструктуру, что позволяет ткани адаптироваться к различным механическим нагрузкам. Связочный аппарат мениска состоит из медиальной коллатеральной связки, поперечной связки, мениско-бедренных связок и крепления на плато большеберцовой кости передним и задним рогами [64]. Мениск также играет решающую роль в переносе и передаче нагрузки, поглощении ударов, а также в смазке и питании суставного хряща [11, 17, 19, 94].

На данный момент известно о трех различных силах, действующих на мениск – сила сдвига, компрессия и растяжение [60].

Компрессионные силы оказываются под воздействием осевой большеберцовой силы при движении сустава в результате повседневной деятельности. Клиновидная форма мениска и его роговые крепления служат для преобразования вертикальных сжимающих усилий в горизонтальную силу напряжения по ходу продолговатых волокон коллагена, идущих по кольцу от переднего к заднему рогу [152].

Горизонтальное усилие обруча дополнительно преобразуется в окружное и радиальное растягивающие усилия за счет выравнивания коллагеновых волокон. В то же время между коллагеновыми волокнами внутри мениска возникают силы сдвига [155].

Было подсчитано, что неповрежденные мениски занимают приблизительно 60% площади контакта между суставным хрящом мыщелков бедренной кости и

плато большеберцовой кости, при этом они передают >50% общей осевой нагрузки, приложенной к суставу [118].

Однако эти показатели в значительной степени зависят от степени сгибания колена и состояния тканей. На каждые 30° сгибания поверхность контакта в тибioфemorальном суставе уменьшается на 4%. При сгибании колена на 90° приложенная осевая нагрузка в суставе на 85% больше, чем при сгибании 0°. При полном сгибании колена латеральный мениск передает 100% нагрузки в латеральный отдел колена, тогда как медиальный мениск принимает на себя примерно 50% медиальной нагрузки. И наоборот, значительный интерес представляют изменения площади контакта и силы соприкосновения суставных поверхностей после парциальной или полной резекции мениска [118].

G.A. Paletta et al. (1997) исследовали биомеханические эффекты полного удаления латерального мениска у 10 трупных коленных суставов и сообщили об уменьшении общей площади контакта на 50%, что привело к увеличению пиковой локальной контактной нагрузки на 235–335% [164]. В аналогичном исследовании Н. Kurosawa et al. (1980) отметили, что после тотальной менискэктомии площадь большеберцово-бедренного контакта уменьшилась примерно на 50%, что привело к общему увеличению контакта [111].

Момент приведения колена (МПК) – кинетический показатель, который отражает нагрузку на медиальные отделы коленного сустава. Большее значение МПК ассоциировано с увеличением варусной нагрузки и давления на медиальные отделы сустава, которые напрямую коррелируют с толщиной суставного хряща медиального отдела и прогрессированием остеоартроза коленного сустава [63, 89].

J.B. Thorlund et al. (2016) провели трехмерный анализ походки 23 пациентов с разрывом медиального мениска без остеоартроза коленного сустава до и через 1 год после частичной менискэктомии. Несмотря на значительное улучшение показателей по шкале оценки функционального состояния коленного сустава после перенесенной травмы и остеоартроза, наблюдалось постоянное увеличение пика МПК после менискэктомии по сравнению с контралатеральной конечностью [76].

1.3. Разрывы мениска коленного сустава

По отношению ко всем травмам менисков частота повреждений медиального мениска составляет от 46,5% до 87% случаев, а латерального — от 2,7% до 15%. Выделяют несколько основных механизмов повреждения менисков при не прямой травме: резкое сгибание голени в момент приседания, вращение бедра при фиксированных голени и стопе или резкая ротация голени и стопы при фиксированном положении бедра [26, 35].

В 1991 году D.E. Cooper et al. предложили классификацию на основе кровоснабжения мениска: лучше всего происходит заживление при разрывах в зоне с хорошо кровоснабжаемой менисковой тканью (зона 1). При повреждении мениска в аваскулярной зоне (зона 3) заживление происходит медленнее или не происходит вовсе. Также отмечается промежуточная зона (зона 2) [81].

Исследователи также разделяют разрывы на стабильные и нестабильные по отношению к разорванным частям мениска, которые могут блокировать сустав и вызывать сильный болевой синдром [174]. По свежести травмы различают свежий разрыв, срок давности до 6 недель, и более поздний или хронический разрыв [132].

Международная классификация повреждения менисков, разработанная в 2006 году International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine, основана на морфологической характеристике повреждения. Повреждения мениска можно классифицировать в зависимости от характера и локализации разрыва [107, 109].

Типы разрывов включают вертикально-продольные разрывы, косые разрывы (клюв попугая или закрылки), радиальные разрывы, горизонтальные (поперечные или расщепленные) разрывы и сложные комбинированные разрывы [119].

Помимо этого, разделяют отдельные классификации повреждения рампы [77] и классификацию повреждения рога мениска С.М. LaPrade [123]. Приведенные классификации разрывов мениска служат клиницистам для определения хирургической тактики лечения пациента.

1.4. Лечение разрывов мениска коленного сустава

Лечение разрывов менисков зависит от многих факторов. Помимо вышеперечисленных классификаций учитываются возраст пациента, анамнез, генез, тип и локализация разрыва [40]. Основываясь на результатах функциональных тестов, клинических проявлений разрыва мениска и результатов МРТ коленного сустава, встает выбор между консервативным и оперативным лечением [16]. Консервативное лечение показано малоактивным пациентам при наличии слабовыраженных симптомов разрывов менисков [173].

Существует несколько хирургических вариантов лечения разрывов мениска. Они включают полную и частичную менискэктомию; шов мениска и его реконструкцию, при которой для замены сегмента отсутствующего мениска используется аллогraft или скаффолд мениска. Восстановление мениска является приоритетной задачей в тех случаях, когда отсутствует или устранена нестабильность связочного аппарата коленного сустава, имеются только периферические разрывы мениска, и в случаях повреждений у молодых и физически активных пациентов [137].

До недавнего времени одним из оптимальных решений была резекция мениска коленного сустава [132, 174]. Однако на данный момент доказано, что частичная резекция мениска приводит к увеличению контактного давления на гиалиновый хрящ обеих костей более чем на 350%, что в свою очередь ведет к быстрому развитию дегенеративных процессов хрящевой ткани коленного сустава [81, 154, 173].

Шов мениска. Показаниями к выполнению шва мениска, согласно консенсусу European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy от 2019 года, являются продольные разрывы длиной более 10 мм, включая разрывы по типу «ручки лейки», радиальные разрывы во внешней трети мениска (зоне 1) и в средней трети мениска (зона 2) по классификации D.E. Cooper и разрывы корней менисков [81].

Описаны разные техники шва мениска: «изнутри наружу», «снаружи внутрь» и «все внутри» [7]. Каждая техника может применяться для шва разрывов различных локализаций. В нескольких систематических обзорах не было обнаружено различий в клинических исходах, частоте неудач или осложнений между техникой шва мениска «полностью изнутри» и «изнутри наружу» [61].

Однако существуют специфичные для определенной техники осложнения. Так, например, техника «все внутри» чаще ассоциируется с осложнениями, связанными с имплантацией шовного материала (развитие кист, миграция устройства или повреждение шовного материала), в то время как метод «изнутри наружу» связан с проблемами повреждения нервов, включая раздражение или травмы [79]. В исследовании на модели свиньи показано, что канюли, используемые для наложения швов на мениск, могут привести к существенному повреждению продольных коллагеновых волокон мениска. Именно поэтому важно выполнять прокол канюлей по ходу волокон [158].

Различные систематические обзоры и мета-анализы сообщают о хороших краткосрочных и среднесрочных результатах после шва мениска. Частота повторных разрывов варьирует от 10 до 19% в разных исследованиях [158].

Следует отметить, что не все повреждения мениска поддаются данному лечению. Дегенеративные, сложные или большие разрывы, особенно те, которые находятся в бессосудистой области, невозможно восстановить при помощи швов [154].

Для потенцирования регенерации в области шва мениска были предложены вспомогательные методики для аугментации: трепанация мениска и абразивная техника, использование обогащенной тромбоцитами плазмы (Platelet Rich Plasma, PRP) и фибринового клея [112].

Абразивная техника в большинстве случаев будет повреждать структуру мениска и, в конечном счете, влиять на его биомеханику и приводить к последующим повреждениям тканей коленного сустава. Применение биологической аугментации в виде фибринового сгустка или PRP в области бессосудистой зоны мениска являются менее обнадеживающими. Основным

недостатком PRP является значительная вариабельность между PRP, полученными от разных людей, и с использованием различных коммерческих систем, с различиями в количестве тромбоцитов, включении лейкоцитов и активации тромбоцитов [68, 161]. Клинические исследования по использованию PRP для лечения разрывов мениска: два исследования типа «случай–контроль» [142, 145] и один отчет о клиническом случае [70] – показывают противоречивые результаты.

По данным систематического обзора, субъективное улучшение показателей функциональных тестов отмечено после восстановления мениска с помощью биологической аугментации, однако, преимущества в отношении усиления регенеративных процессов по сравнению со стандартным швом мениска подвергаются сомнению [72].

Трансплантация менисков. Существуют разрывы мениска, при которых целесообразно проводить трансплантацию. Трансплантация аллогенного мениска была внедрена в клиническую практику более 30 лет назад как методика для пациентов, которые перенесли менискэктомию с последующим развитием болевого синдрома в коленном суставе [117].

Ограничения аллотрансплантаций включают узкий спектр показаний для ее проведения. Данная методика может быть применена у пациентов в возрасте до 55 лет при наличии стабильного связочного аппарата коленного сустава и отсутствии отклонений оси конечности от нормальных значений. Степень выраженности артроза, присутствующего до операции, является ключевым фактором, определяющим исход процедуры. При наличии выраженного ОА данная операция противопоказана [121].

Наиболее часто используются глубокозамороженные и криоконсервированные менисковые аллотрансплантаты. Наблюдается тенденция к использованию свежих аллотрансплантатов. После исследования, проведенного S.A. Rodeo et al. (2000), свежий трансплантат был признан более эффективным, поскольку во время имплантации было достигнуто сохранение жизнеспособных фиброхондроцитов [99].

Очевидно, что использование свежих аллотрансплантатов сопряжено с логистическими трудностями, связанными с необходимостью подбора совместимых донора и реципиента в течение 7 дней, до снижения клеточной активности трансплантата [120].

Основной технической трудностью в подборе трупного материала является несоответствие размера и формы донорского мениска и области его имплантации в коленный сустав реципиента. Еще одним вопросом для обсуждения является метод фиксации трансплантата мениска. Фиксация трансплантата с костным блоком обеспечивает меньшее выдавливание, что связано с улучшением функции трансплантата и снижением скорости разрушения суставного хряща. Однако в случае трансплантации комплекса мениска и костного блока дополнительная травматичность процедуры объясняется необходимостью адаптации костного блока к суставу [184].

Выживаемость трансплантата в первые 5–7 лет колеблется от 80 до 90%, однако с течением времени начинает снижаться, достигая примерно 50% к 20 годам после трансплантации и 15% к 24 годам после трансплантации. Основная проблема первоначального неполного восстановления, по-видимому, частично вызвана отсоединением трансплантата от капсулы или неспособностью трансплантата реваскуляризироваться из-за неправильного расположения внутри коленного сустава [138].

Сложности, связанные с трансплантацией менисковой ткани, существенно ограничивают широкое применение при разрывах мениска. Некоторым пациентам была предложена профилактическая трансплантация аллотрансплантата мениска при отсутствии болевого синдрома, но в настоящее время проведение операций такой категории пациентов не рекомендуется [106].

При сохранении выраженного послеоперационного болевого синдрома процесс восстановления после трансплантации мениска замедляется и отдаляет сроки возвращения в повседневную активную жизнь. Одной из целей трансплантации является предотвращение дегенеративных изменений хрящевой ткани сустава. Однако результаты современных исследований показывают, что не

удается добиться достаточных хондропротективных свойств от данной методики [186].

Именно поэтому поиски эффективных методик замещения утраченной ткани мениска привели к появлению искусственных конструкций – тканеинженерных скаффолдов и протезов мениска [78, 118].

1.5. Тканеинженерный подход к созданию скаффолдов мениска коленного сустава

Отдельно можно выделить синтетические протезы мениска, которые на данный момент времени находятся на стадии клинической апробации – протез мениска из поликарбоната-уретана Nusurface (Израиль) и из нерезорбируемого полимера Artimis (Дания) [179]. Задача таких протезов заключается в перераспределении нагрузки, аналогичной нагрузке нативного мениска, при этом они располагаются в полости сустава без последующего замещения менисковой ткани. Предварительные результаты показывают, что протез способен уменьшать боль после менискэктомии и оставаться целым, однако техника его фиксации все еще требует доработки [166].

Еще один протез мениска, произведенный на 3D-принтере с импрегнацией коллагена и гиалуроновой кислоты MeniscoFix, зарегистрированный как имплант из полимера для полной замены мениска с последующей регенерации новоменисковой ткани [140]. Усиленная волокнами структура обеспечивает возможность прикрепления как к мягким тканям, так и к кости, что делает возможной полную замену мениска [179]. В настоящее время биомеханические испытания и краткосрочные исследования на овцах демонстрируют потенциал MeniscoFix для частичной и полной замены мениска, подтверждая его эффективность в биомеханике и формировании неоменисковой ткани [171]. Однако для уменьшения процента неудачных операций у овец требуется совершенствование метода фиксации и хирургической техники [171].

Скаффолд мениска представляет собой имплантат, предназначенный для восстановления или замещения частичных дефектов мениска, особенно у пациентов, испытывающих боли после менискэктомии. Концепция скаффолда основана на его постепенном замещении неоменисковой тканью при сохранении формы и первоначальной структуры [96, 130].

Имплантация скаффолда проводится строго по медицинским показаниям и направлена на улучшение биомеханической функции мениска в коленном суставе после частичной менискэктомии. Для успешной процедуры необходимы следующие условия: восстановление связочного аппарата коленного сустава, коррективировка осевой линии конечности и наличие низкого индекса массы тела [133].

На данный момент в Европе доступны два вида менисковых скаффолда, предназначенных для реконструкции или замещения частичных дефектов мениска: коллагеновый имплантат мениска CMI (Ivy Sports Medicine, Гreifelfing, Германия), изготавливаемый из коллагена I типа бычьего ахиллового сухожилия, и полимерный синтетический каркас Actifit (Orteq Bioengineering, Лондон, Великобритания), который изготовлен из смеси поликапролактона (ПКЛ) и уретана [133].

Актуальные исследования демонстрируют безопасность и положительные ранние и среднесрочные клинические результаты при применении скаффолдов [136, 137, 147]. Через 12 месяцев после имплантации скаффолдов проведена биопсия для гистологической оценки, которая выявила фиброзноподобную ткань, богатую сосудами, в импланте CMI. В то же время после имплантации Actifit на его месте сформировалась хрящеподобная аваскулярная структура. В обоих случаях экстрацеллюлярный матрикс и клетки характеризовались гетерогенным распределением внутри скаффолда, что может указывать на неравномерное распределение нагрузки на каркас. Признаков некроза в новообразованной ткани мениска в обоих имплантах не обнаружено. Суставной хрящ выглядит интактно и без появления новых повреждений у большинства пациентов в двух группах [136].

Большинство исследователей отмечают трудности, связанные с фиксацией скаффолда к капсуле сустава [45, 125, 126]. R. Verdonk et al. (2011) описывали в исследовании метод фиксации задней части скаффолда мениска к заднему рогу мениска по технике шва «все внутри» [127, 170]. Среднюю и переднюю часть скаффолда возможно пришить любой техникой – «все внутри», «изнутри наружу», «снаружи внутрь». Ход одиночных швов должен быть с шагом примерно 0,5 см [128].

Механическая слабость и изменение формы каркасов после их трансплантации обуславливают необходимость в поиске и разработке новых моделей скаффолдов мениска, а также новых оперативных методик по фиксации скаффолдов внутри коленного сустава. При двухлетнем наблюдении по данным МРТ отмечали заполнение места скаффолда новой тканью и изменение изначальной формы скаффолда. Размеры скаффолда уменьшились на 61% у группы пациентов СМІ [137] и на 79% у группы пациентов с Actifit [129], что связывают с действием неравномерных нагрузок в суставе.

Последние систематические обзоры свидетельствуют о наличии крайне ограниченных однородных клинических данных по менисковым каркасам. Это связано с отсутствием стандартизированных критериев оценки результатов и значительным количеством сопутствующих хирургических вмешательств, которые затрудняют объективную интерпретацию данных [126, 179].

В.Р. Chan и К.В. Leong (2008) отмечают наиболее перспективную комбинацию для тканевой инженерии мениска в сочетании скаффолда, клеток и биоактивных агентов с целью усиления регенеративного потенциала [75]. Аугментация клетками и факторами роста была протестирована только в доклинических *in vivo* исследованиях на мелких лабораторных животных [53, 73, 141].

Тем не менее, дальнейшее внедрение этой концепции в клиническую практику замедлилось из-за роста расходов на использование клеточных культур и строгих регуляторных норм, ограничивающих клеточные методы в ряде стран [72].

При создании бесклеточного каркаса следует уделить особое внимание двум фундаментальным аспектам, определяющим его эффективность: выбору материала для формирования скаффолда и методологиям его изготовления [74].

Исследователи выделяют следующие основные требования к материалам для производства скаффолдов [57, 178]:

- биосовместимость как самого каркаса, так и продуктов его распада с тканями организма;
- скорость разрушения материала должна соответствовать темпу образования новой ткани мениска, обеспечивая постепенное замещение;
- достаточные механические свойства, обеспечивающие прочность каркаса на весь период его замещения новообразованной тканью мениска;
- материал скаффолда должен стимулировать рост и развитие новой ткани, поддерживая ее функциональность;
- конструкция должна быть финансово оправданной, чтобы ее использование стало возможным для лечения большого числа пациентов.

Скаффолды могут изготавливаться как из синтетических, так и из природных материалов. К природным материалам относятся коллаген [27, 126], желатин [117], гиалуроновая кислота, агароза и другие гидрогели [100]. Природные биоматериалы активно используются для стимулирования регенеративного потенциала, так как они обладают хорошей биосовместимостью и биорезорбируемостью. Коллагеновые импланты, эффективность применения которых доказана в экспериментальном исследовании на крупных лабораторных животных, уже используются в клинической практике для лечения дефектов хрящевой ткани коленного сустава [47, 49].

Однако механическая прочность биологических материалов уступает синтетическим аналогам. Исследования показывают, что каркасы из природных полимеров быстрее деградируют, уменьшаются в размерах и могут разрушаться во время фиксации к суставной капсуле [21, 122].

В качестве альтернативного подхода к производству биомиметического бесклеточного каркаса J.C. Ruprecht et al. (2019) предложили использовать процесс

децеллюляризации неповрежденной ткани резецированного мениска. Это позволяет сохранить нативную структуру и организацию коллагеновых волокон на микроуровне [129]. Кроме того, данный тип скаффолда, как ожидается, будет иметь гораздо меньший иммуногенный потенциал. Среди основных проблем, связанных с использованием децеллюляризованной ткани, плотная структура внеклеточного матрикса, неправильное прилегание и несоответствие размеров суставным поверхностям, что снижает клеточную инфильтрацию этих каркасов [122, 129].

Синтетические материалы, такие как ПКЛ [33, 38, 146], полиуретан [91, 148], полимолочная кислота [18, 20] и полимолочно-ко-гликолевая кислота [68], широко применяются в биомедицинских исследованиях [42]. Эти полимеры характеризуются высокой механической прочностью. Однако перед их использованием в экспериментах на животных моделях важно учитывать время разложения материала и продукты его деградации в различных биологических средах [45]. Например, продукты разложения полиуретана удаляются макрофагами и гигантскими клетками или интегрируются в окружающие ткани [103]. Продукты распада полимолочно-ко-гликолевой кислоты создают кислую среду, которая затрудняет рост и дифференцировку клеток в области имплантации вокруг капсулы сустава. Некоторые синтетические материалы разрушаются быстрее, чем успевает сформироваться новая ткань мениска. В то же время по сравнению с натуральными материалами синтетические аналоги снижают риск передачи инфекций при имплантации в организм [133]. Отсутствие биологических сигналов в синтетических биоматериалах снижает их биосовместимость [39].

Наиболее часто применяемым полимером среди исследователей тканевой инженерии мениска для изготовления скаффолдов из имеющихся биосовместимых синтетических материалов является ПКЛ [56, 146, 151]. Скорость деградации данного материала определяется его молекулярной массой и варьируется в пределах от одного до трех лет. Конструкции, выполненные из ПКЛ, характеризуются способностью сохранять механическую прочность на протяжении длительного времени при воздействии циклических нагрузок [146]. Материал обладает высокой технологичностью, что обеспечивает его широкое

применение в различных формах при аддитивных производственных процессах. Тем не менее, ПКЛ является гидрофобным, что ограничивает адгезию клеток на его поверхности, которая возможна только при наличии биоактивных молекул [122].

За последние пять лет гидрогели активно применяются в доклинических исследованиях [62]. Эти материалы представляют собой полужидкие гидрофильные коллоиды, которые состоят из сети сшитых полимерных цепей, природного или синтетического происхождения. Гидрогелям легко придать необходимую форму, а также они могут равномерно смешиваться с клетками и факторами роста. Их физические свойства зависят от содержания воды, причем более высокая пористость способствует лучшей диффузии клеток. Однако гидрогелевые каркасы не способны выдерживать нагрузки, сопоставимые с нативным мениском, что ограничивает их использование в качестве самостоятельного скаффолда [58].

Комбинированный состав скаффолдов на данный момент представляет наибольший интерес. Так, например, в исследовании G. Bahcecioğlu et al. (2019) удалось комбинировать ПКЛ основу, напечатанную на 3D-принтере с пропитыванием агарозой во внутренней части мениска и желатина метокрелата во внешней, добившись при этом условий в которых во внутренней части скаффолд похож на хрящ, а во внешней – на фиброзно-хрящевую ткань [54].

Таким образом, существующие скаффолды менисков коленного сустава имеют ряд недостатков, включая недостаточные механические характеристики, уменьшение размеров в процессе использования и слабую регенеративную способность [57, 157]. Большинство современных разработок остаются на стадии экспериментальных исследований и пока не внедрены в клиническую практику [122].

Методы изготовления скаффолдов мениска. Учитывая предыдущие указанные недостатки, можно отметить следующие характеристики при выборе метода изготовления скаффолда: сочетание биомеханической надежности, высокой биосовместимости и способность стимулировать регенерацию тканей для полного восстановления функции мениска [59].

С точки зрения механики конструкции важно учитывать возможность регулирования размера пор, степени пористости и ориентации волокон. Эти же параметры играют ключевую роль в процессе клеточной пролиферации и образовании новых кровеносных сосудов в периимплантной области. Кроме того, необходимо учитывать экономическую эффективность выбранного метода, чтобы обеспечить его практическую применимость и доступность [72, 152].

Пористые конструкты возможно изготовить в виде губчатых каркасов при помощи физической или химической обработки материала скаффолда с соответствующим изменением давления и/или температуры. В настоящее время подобные методики менее популярны, поскольку следовые концентрации реагентов, используемых в процессе изготовления, могут оказывать негативное влияние на клетки и окружающий экстрацеллюлярный матрикс мениска. Ввиду того, что свойства таких каркасов изотропны, и их внутренняя структура в значительной степени зависит от процесса изготовления, очень трудно контролировать размер и геометрию пор, их распределение, взаимосвязь и общую пористость [85].

Технология электроспиннинга позволяет производить биоразлагаемые волокна разных диаметров, которые потенциально способны имитировать ультраструктуру и механические свойства естественного мениска [48]. В ряде исследований рассматривается использование этого метода для создания скаффолдов [25, 86, 144, 163]. Полимерные растворы формируют волокна под воздействием электромагнитного поля, которые накапливаются на коллекторе. Для придания скаффолду нужной формы требуются специальные формующие заготовки [163].

Однако метод имеет ограничения: неравномерное распределение волокон приводит к созданию тонкослойных структур, а небольшая пористость затрудняет проникновение клеток в глубинные слои. Эти недостатки ограничивают применение электроспиннинга в чистом виде, и технология чаще используется в сочетании с другими методами [59] .

К аддитивным методам производства, применяемым в медицине, относят: 3D-нанесение / прямая запись чернилами, стереолитография (Stereolithography) [87], селективное лазерное спекание (Selective Laser Sintering) [55], моделирование методом наплавленного осаждения (Fused Deposition Modeling, FDM) [30].

Биопринтинг выделяется среди аддитивных технологий благодаря использованию клеток, заключенных в гидрогели [150]. Он включает три основных метода: экструзионный биопринтинг, струйную печать и световую биопечать [24, 71].

Вышеперечисленные методики позволяют создавать скаффолды с заданными параметрами (диаметр волокон и свойства пор) [31, 74]. В литературе последних лет наиболее часто упоминается FDM для производства скаффолдов мениска [52, 54, 80, 141].

FDM-печать позволят быстро напечатать конструкт из различных синтетических полимеров, при условии удачной настройки принтера и наличия сопла необходимого диаметра [23].

В актуальных исследованиях по печати скаффолдов мениска толщина пор должна варьировать от 200 до 400 мкм. В одном из исследований в ходе эксперимента было определено, что наилучшие регенеративные свойства клеток, привитых на ПКЛ-скаффолд, были получены при размере пор 215 мкм (в сравнении с порами размером 320 мкм и 515 мкм) [153].

Аддитивные технологии позволяют создавать на одном и том же принтере как модели для мелких лабораторных животных, так и персонализированные импланты мениска коленного сустава, адаптированные под конкретного пациента [56].

Другие возможности открываются при использовании 3D-печати с двумя соплами и применением термопластичного материала (например, ПКЛ) и гидрогелевого компонента. В этом случае механическая стойкость первого компонента дополняется способностью создания благоприятной для клеток среды за счет гидрогеля. Конструкции могут быть изготовлены путем чередования нитей ПКЛ с гидрогелем, насыщенным клетками. В качестве альтернативы

предварительно изготовленные 3D-печатные скаффолды могут быть пропитаны гидрогелями [50].

Пути совершенствования скаффолдов мениска коленного сустава. Возможно добиться персонализированной формы скаффолда мениска с помощью нужных нам синтетических материалов для сохранения механических свойств создаваемого импланта. Второй важной составляющей скаффолда мениска является регенеративный потенциал, добиться которого исследователи предлагают разными методами.

ПКЛ основа скаффолда плохо поддерживает жизнедеятельность клеток, поэтому исследователи проводят модификацию различными способами. Например, химическая модификация с помощью обработки изделия раствором NaOH делает изделие гидрофильным и пригодным для существования клеток на его поверхности [131]. В некоторых исследованиях используется физическая модификация в виде плазменной обработки [44, 144].

Химическая модификация полимерных скаффолдов с использованием гидрогелей биологического происхождения, таких как желатин, гиалуроновая кислота, коллаген, альгинат и другие, является распространенным подходом в исследовательской практике. В некоторых работах также применяются факторы роста, которые играют ключевую роль в метаболической активности клеток менисковой ткани, регулируя их развитие, поддержание гомеостаза, обновление и регенерацию. Ранее была описана модификация ПКЛ-скаффолда мениска только гидрогелем из коллагена I типа в *in vivo* эксперименте на новозеландских кроликах с удовлетворительным результатом, однако с неполной регенерацией менисковой ткани [160].

С целью регенерации ткани или фиброхондроцитов мениска некоторые исследователи применили факторы роста. Наиболее часто используемыми факторами роста для лечения ткани или фиброхондроцитов мениска являются основной фактор роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor basic) [149], трансформирующий фактор роста бета 1 и 3 (Transforming Growth Factor Beta) [105, 114] и инсулиноподобный фактор роста 1 (Insulin-like Growth Factor) [82, 165], при

этом другие используются реже [78]. Имеются исследования с применением аптамеров для привлечения мезенхимальных стволовых клеток в тканевой инженерии менисков с применением на моделях новозеландских кроликов с положительными результатами и хондрогенноподобным строением менискового скаффолда [104].

Тем не менее, остаются нерешенными вопросы, связанные с выбором оптимального сочетания ростовых факторов, их дозировок и кинетики высвобождения. Недавние достижения в области тканевой инженерии менисков направлены на создание зонально организованных тканевых конструкций, которые стремятся воспроизвести анизотропную ультраструктуру человеческого мениска. С экономической точки зрения предпочтительно использовать простые модификации, которые легко воспроизвести и внедрить в производство [139].

Тот факт, что аугментация клетками и факторами роста была протестирована только в доклинических условиях *in vivo*, может быть объяснен несколькими причинами: очевидным увеличением затрат, строгими нормативными актами, ограничивающими клеточные подходы во многих странах, а также техническими проблемами, связанными с загрузкой аутологичных клеток / факторов роста в биосинтетические каркасы для дальнейшего использования. применение человеком [72].

Таким образом, существующие методы лечения при разрывах менисков коленного сустава не являются идеальными с точки зрения регенерации ткани мениска и возможных осложнений при оперативных реконструктивных операциях [58, 82, 136]. Возможным решением усовершенствования лечения является применение подходов тканевой инженерии, а именно создание скаффолдов на комбинированной основе для последующего восполнения ткани мениска, устранения болевого синдрома и хондропротекции для предотвращения последующего развития остеоартроза.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общий дизайн исследования

Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, состоящее из четырех последовательных этапов (Рисунок 2.1).

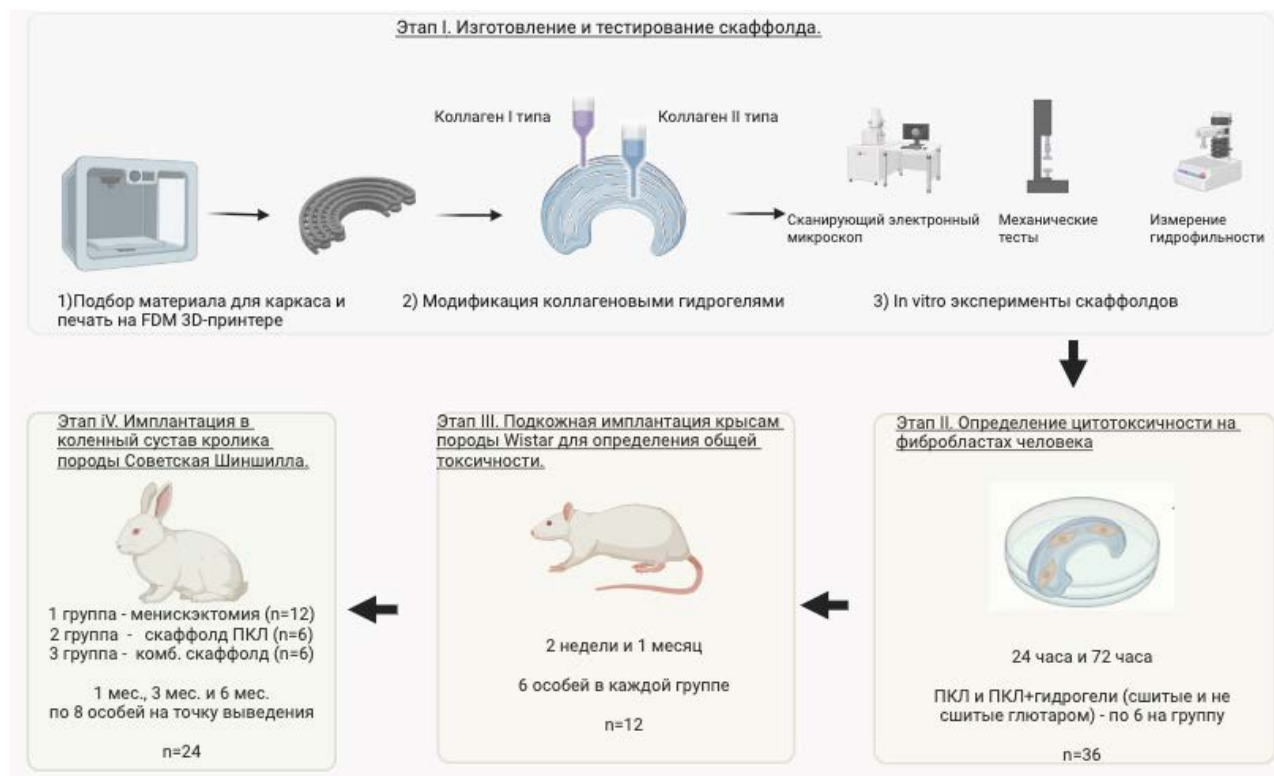


Рисунок 2.1 – Дизайн диссертационного исследования

На первом этапе осуществляли подбор материалов, средства производства скаффолда мениска коленного сустава и проводили испытания скаффолдов в экспериментах *in vitro*. После изготовления скаффолдов проводили механические тесты на сжатие и растяжение на 6 группах с 5 образцами каждого вида скаффолда в сравнении с группой нативных медиальных менисков кролика. Исследовали ПКЛ-скаффолды, напечатанные при различной температуре, а также скаффолды в комбинации с коллагеновыми гидрогелями первого и второго типов. Помимо механических тестов в *in vitro* исследования входила оценка параметров толщины балок и пор на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ). Также оценивали

изменения гидрофильности на представленных образцах скаффолдов в сухом виде и при погружении в физиологический раствор на 30 минут.

На втором этапе с целью определения цитотоксичности произведенных скаффолдов менисков все образцы разделили на три группы – ПКЛ-скаффолд, ПКЛ-скаффолд с коллагеновыми гидрогелями, сшитые глютаровым альдегидом, и ПКЛ с гидрогелем, не сшитые глютаровым альдегидом (комбинированные скаффолды). В каждой группе было по 6 образцов скаффолдов. На поверхности скаффолдов менисков культивировали фибробласты человека и оценивали их жизнеспособность спустя 24 часа и 72 часа.

На третьем и четвертом этапах проводили *in vivo* эксперименты с лабораторными животными. Все эксперименты на животных были одобрены Локальным этическим комитетом Сеченовского Университета (протокол заседания №17-23 от 05.10.2023 года).

На третьем этапе выполняли подкожную имплантацию скаффолдов на моделях крыс породы Wistar на 12 особях, поделенных поровну на две группы в соответствии с точками выведения – 2 недели и 1 месяц. После эвтаназии скаффолды были иссечены для последующих гистологических исследований с целью выявления воспалительных реакций на созданные скаффолды и скорости их биодеградации внутри живого организма.

Для определения функциональности скаффолда как каркаса и регенеративных способностей проводили четвертый этап в эксперименте *in vivo* на кроликах породы Советская Шиншилла. Общее количество особей в количестве 24 единицы было поделено поровну между экспериментальной группой и контрольной группой. Контрольными точками эксперимента являлись 30-й, 90-й и 180-й день после оперативного вмешательства. Непосредственно после оперативного вмешательства на протяжении двух недель проводили оценку качества жизни кроликов. На каждой контрольной точке выводили по 4 кролика из каждой группы. Животные были подвергнуты эвтаназии летальной дозой лидокаина гидрохлорида (10%, 6 мл) внутривенно болюсно. После выведения животных из эксперимента области коленных суставов выбривали, далее

проводили удаление ранее оперированных конечностей по средней трети бедренной кости и нижней трети костей голени для последующих МРТ, механических испытаний, визуальной оценки и гистологических исследований скаффолдов и суставных поверхностей бедренной и большеберцовых костей испытываемых.

2.2. Создание и тестирование скаффолда мениска коленного сустава

2.2.1. Изготовление скаффолда (первый этап исследования)

Для решения задачи первого этапа исследования был проведен анализ литературы, на основе которого выбрали ПКЛ в качестве основы для производства скаффолда мениска коленного сустава.

ПКЛ широко используется исследователями как материал, изделия из которого являются биосовместимыми, не токсичными и могут переносить циклические механические нагрузки.

Исследователи использовали для своих целей ПКЛ от 40 кДа до 90 кДа [52, 54, 141]. Для производства скаффолдов мениска был выбран ПКЛ с молекулярной массой 50 кДа в виде филамента для печати на FDM 3D-принтере.

Для ПКЛ характерна низкая температура плавления, однако при работе с конкретными образцами неизвестны точные пределы температуры, после которых происходят изменения в структуре выбранного материала [45].

Именно поэтому необходимо было провести испытания полимера до печати для выяснения температуры деструкции и температуры изменения свойств ПКЛ. С целью определения оптимальной температуры было проведено испытание полимера на синхронном термическом анализаторе STA 6000, а исследование химической структуры поликапролактонового филамента и скаффолда на его основе исследовано с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье многократного нарушенного полного внутреннего отражения на приборе

Spectrum Two (“Perkin-Elmer”, США). Результаты исследований легли в основу выбора принтера и параметры его настройки для нужной нам печати.

Моделирование скаффолдов менисков коленного сустава на компьютере и их печать на FDM 3D-принтере. Модель скаффолда мениска коленного сустава конструировали при помощи компьютерной программы Ansys SpaceClaim 2023R1 согласно размерам нативного мениска коленного сустава кролика (диаметр окружности мениска равен 10 мм, высота внешней стороны мениска – 1 мм). Данный размер был выбран с целью дальнейшей трансплантации конечного изделия на место резецированного медиального мениска коленного сустава кролика.

В актуальных исследованиях толщина пор варьирует от 200 до 400 мкм. Группой исследователей Z.Z. Zhang et al. (2016) в ходе эксперимента было определено, что наилучшие регенеративные свойства клеток, привитых на ПКЛ-скаффолд, были получены при размере пор 215 мкм (в сравнении с порами размером 320 мкм и 515 мкм) [153].

Вышеописанные данные были приняты за основу для представленного исследования и было определено остановиться на толщине балок 300 мкм с толщиной пор в 200 мкм.

С целью выбора оптимальной конструкции рассматривалось несколько форм скаффолда с различной решетчатой структурой (расположением балок и пор).

Модификация ПКЛ-скаффолда гидрогелями коллагенов различных типов. В качестве модификации ПКЛ-скаффолдов использовали суспензию коллагена I типа и суспензию коллагена II типа. Для приготовления суспензии коллагена I типа использовали сухожилия крупного рогатого скота, очищенные предварительно от жира и мышечных волокон, а затем разрезанные на фрагменты толщиной 1 см. Для производства суспензии коллагена II типа использовали трахейные хрящи, которые также очистили и разделили на фрагменты толщиной 1 см.

Произведенные фрагменты помещали в раствор Na_2PO_4 на 48 часов, а далее промывали и помещали в раствор NaCl на 24 часа. После промывали сырье в

дистиллированной воде и гомогенизировали в 0,8 М уксусной кислоты до образования вязкой суспензии. Конечную концентрацию коллагена в суспензии определяли с помощью гравиметрического анализа.

После растворы коллагена I и II типов разбавляли до концентрации 6 мг/мл, добавляли пепсин по соотношению сухой массы коллагена к пепсину и проводили низкотемпературный гидролиз в течение 2 суток при постоянном помешивании 150 об/мин. Для остановки процесса гидролиза к суспензии добавляли 1 М NaOH или KOH и нейтрализовали до значений pH в пределах 7,3–7,5.

Далее суспензию коллагена I и суспензию коллагена II типов переосаждали 12%-ным раствором NaCl. Образовавшийся осадок повторно растворяли до 3 мг/мл в 0,5 М уксусной кислоте и подвергали диализу против 0,5 М уксусной кислоты [5].

2.2.2. Оценка физических параметров скаффолдов мениска коленного сустава

Структура. С помощью СЭМ Hitachi TM4000 Plus (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) производили оценку оптимальных параметров балок и пор для скаффолдов мениска коленного сустава. Образцы были закреплены с помощью двухсторонней углеродной ленты на металлической подложке и помещены в камеру микроскопа. Визуализация образцов была оптимальной и не нуждалась в предварительной пробоподготовки и напылении тяжелых металлами.

Сканирование поверхности образцов производилось в камере в среде среднего вакуума, в режиме обратно-отраженных электронов с детектором Back-Scattered Electrons при ускоряющем напряжении 10кВ. Использовали увеличение x300 и x1000 при рабочем расстоянии 7 мм.

Было исследовано 5 групп скаффолдов, напечатанных на FDM 3D-принтере с разной температурой (ходом в 10 градусов Цельсия от 130 до 170 градусов Цельсия); оценивали по 3 образца с каждой группы в нескольких местах с осуществлением замеров.

После модификации ПКЛ-скаффолдов проводилось измерение для выявления архитектоники коллагеновых гидрогелей в разных частях скаффолда. Было исследовано не менее 5 скаффолдов и проанализированы медиальный, срединный и латеральные участки скаффолда (Рисунок 2.2).

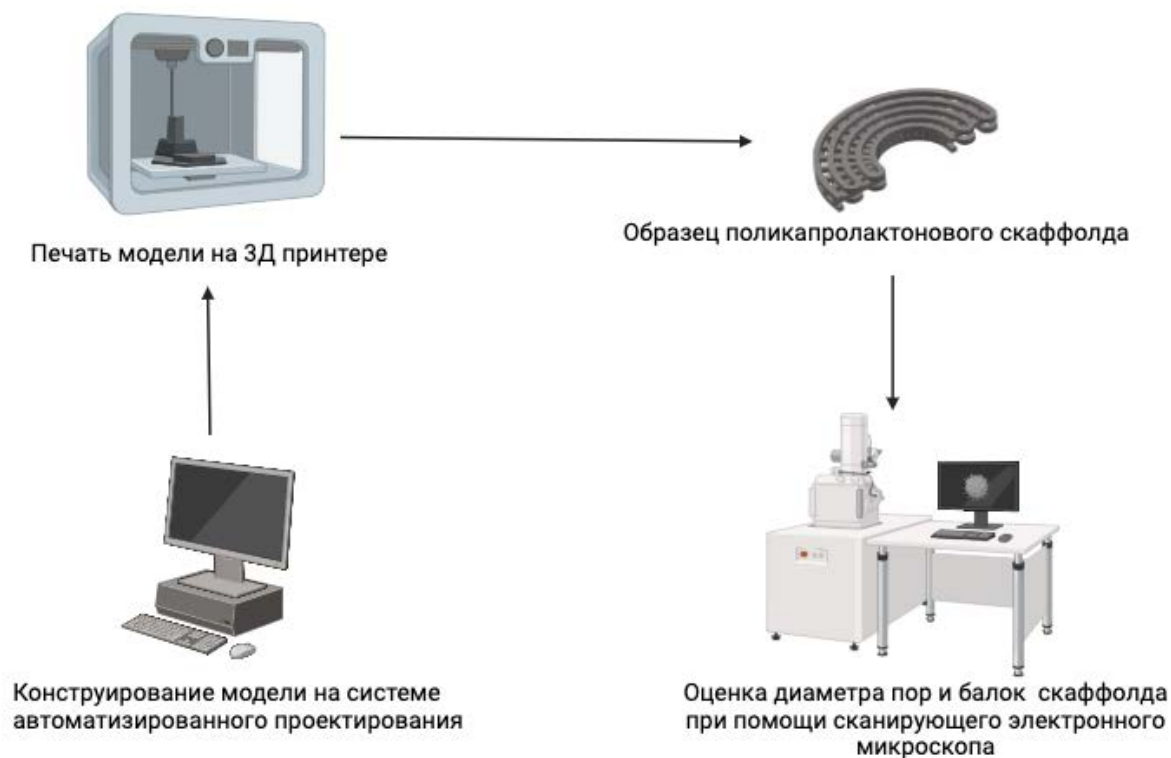


Рисунок 2.2 – Построение модели мениска по заданным параметрам с верификации результата при помощи СЭМ и последующего реконструирования

Механические характеристики. Испытания изготовленных на 3D-принтере конструкторов и в комбинации с коллагеновыми гидрогелями на механические свойства производились на Универсальной системе для механических тестов BioMomentum Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc, Лаваль, Канада) (Рисунок 2.3). Перед исследованием образцы хранились около 12 часов в фосфатно-буферном солевом растворе при комнатной температуре.

Для измерения механических свойств напечатанных конструкторов и выделенных менисков их помещали на жесткую платформу, после чего проводили индентирование рубиновым сферическим индентором (радиус 1 или 0,5 мм) со скоростью 0,1 мм/с. Образцы менисков коленного сустава кролика отделенных от сустава закрепляли в специальных металлических тисках, влажность образца

поддерживали с помощью фосфатно-солевого буфера. Кривые индентации обрабатывали моделью Герца с коррекцией на конечную толщину образца, в итоге получали значения локально модуля Юнга (представлены в МПа).

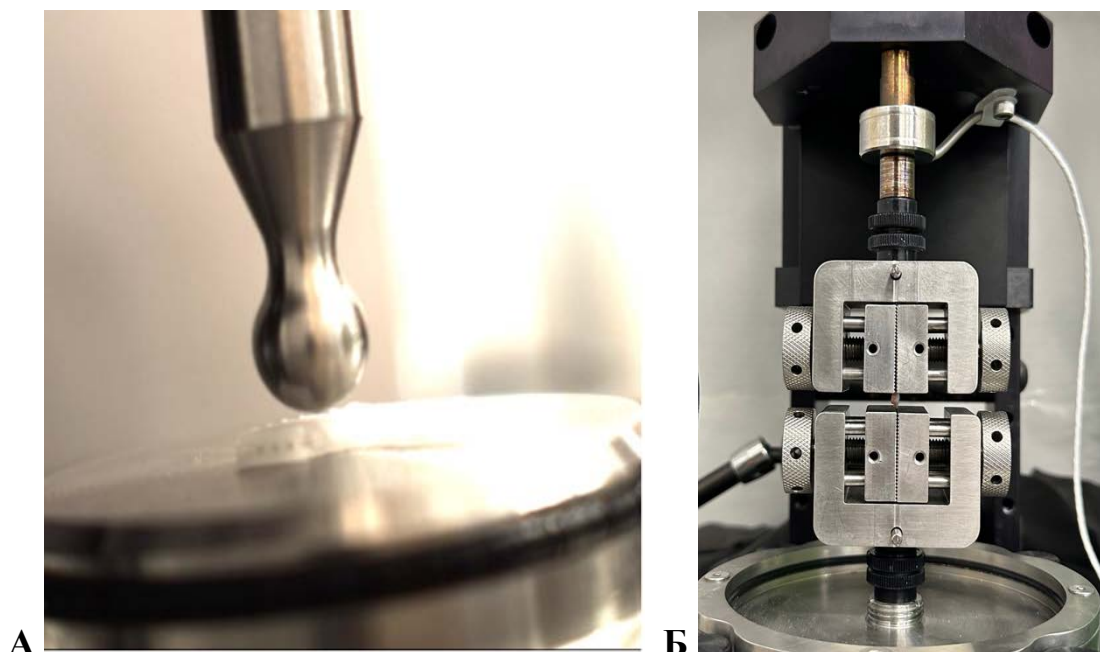


Рисунок 2.3 – Испытание ПКЛ и комбинированных скаффолдов на Универсальной системе для механических тестов BioMomentum Mach-1 v500csst для определения модуля Юнга на сжатие с помощью индентора (А) и для определения модуля Юнга по одноосному растяжению (Б)

Было исследовано 5 групп скаффолдов, напечатанных на FDM 3D-принтере с разной температурой (ходом в 10 градусов Цельсия от 130 до 170 градусов Цельсия), оценивали по 3 образца с каждой группы в нескольких местах с осуществлением замеров.

Показатели измерений скаффолдов ПКЛ и комбинированных скаффолдов сравнивали по отношению к показателям нативных менисков коленного сустава кролика, помещенных в фосфатно-буферный солевой раствор (раствор PBS).

2.2.3. Определение биосовместимости скаффолдов (второй этап исследования)

Характеристика гидрофильности. Для оценки способности клеток адсорбироваться на поверхности полимерного скаффолда проводили исследование смачиваемости каркасов ПКЛ и комбинированных скаффолдов в сухом виде и смоченных в растворе PBS. Измеряли углы смачивания различных скаффолдов дистиллированной водой методом «сидячей капли» на анализаторе контактного угла Acam-MS01 (Apex Instruments, Калькутта, Индия) (Рисунок 2.4). Используя оптические системы измерения угла контакта, проводили замеры в динамике.



Рисунок 2.4 – Анализатор контактного угла Acam-MS01
(Apex Instruments, Калькутта, Индия)

На поверхность скаффолда наносили каплю деионизированной воды, фиксировали угол смачивания и измеряли в трех временных точках (1 с, 5 с и 10 с) при комнатной температуре.

Контактная цитотоксичность с культурами фибробластов. Для определения жизнеспособности клеток, культивированных на скаффолдах мениска, использовали культуру клеток взрослых фибробластов человека.

Поверхности каркасов ($n=6$ в каждой группе) обработали в ультрафиолетовом ламинаре на протяжении 30 минут и засеяли данными типами клеток в концентрации 5×10^4 на одну лунку в 24-луночного планшете. Инкубировали в течение 24 часов и 72 часов.

После чего проводили промывание 5 мл среды с сывороткой 10% ДМЕМ/F12 (Gibco, США) на протяжении 24 часов и 72 часов до диссоциации. Клетки диссоциировали трипсином 5 мл на матрас T75 (Corning; США). Далее – центрифугирование полученных сред на Eppendorf 5413 Micro Centrifuge (США) 600 оборотов на протяжении 5 минут при комнатной температуре. Убирали супернатант – оставляли 100–200 мкл надосадочной жидкости. ДМЕМ/F12 (Gibco, США) с 5 мл 10% телячей сывороткой (HiMedia, Индия) и ресуспендировали клетки.

Проводили подсчет клеток в камере Горяева 10 мкл с 10 мкл трипанового синего для просмотра живых клеток. Количество клеток среднее среди 4 больших квадратов. Общую концентрацию по формуле – среднее количество клеток $\times 2 \times 10^4$ – количество клеток на мл. Из этого объема стоковый раствор сразу – 50 000 клеток на лунку объемом 1 мл. Растворы с клетками оставляли минимум на 12 часов.

Для определения цитотоксичности скаффолдов мениска производилась окраска Резазурином натриевая соль (аламаровый синий) (Cell Viability Reagent, Invitrogen, США) 10 мкл на 100 мкл среды 2 часа в закрытом планшете в стерильных условиях при температуре 37 градусов Цельсия, влажности 90% и концентрации CO_2 $5,0 \pm 1,0\%$. Показания флуорисценции снимали на флуориметре Victor (Perkin-Elmer, США). Среду добавляли 1 раз в объеме 500 мкл через 48 часов.

Изготовленные скаффолды разделены на три группы – ПКЛ-скаффолд, комбинация из ПКЛ-скаффолдов с коллагеновыми суспензиями, сшитыми и не сшитыми глютаром соответственно.

Оценка цитотоксичности является одним из этапов оценки биобезопасности тестируемых материалов скаффолдов мениска коленного сустава. Без последующего исследования не целесообразно переходить к этапам экспериментов *in vivo* на моделях мелких животных.

2.3. Имплантация скаффолда лабораторным животным

2.3.1. Подкожная имплантация скаффолдов мениска

Для оценки острой и подострой воспалительной реакции изготовленные каркасы мениска коленного сустава имплантировали под кожу особям крыс с последующим выведением из эксперимента через 2 недели и 1 месяц.

Модель лабораторной крысы породы Wistar считается наиболее удобной для начальных этапов доклинических исследований. Компактные размеры животных, небольшие затраты на содержание и низкая стоимость позволяют оценить биосовместимость, иммуногенность и токсичность без вовлечения более дорогих моделей [10].

Условия содержания экспериментальных животных соответствовали требованиям следующих нормативных документов: ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, дата введения 2016-07-01» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами, дата введения 2016-07-01» [13]. Крыс содержали в системе индивидуально-вентилируемых клеток с 12-часовым циклом день/ночь и свободным доступом к пище и воде.

Перед имплантацией *in vivo* ПКЛ-скаффолды и комбинированные скаффолды с коллагеновыми гидрогелями предварительно стерилизовали гамма-радиацией. Имплантацию проводили самцам крыс Wistar массой 200 г (n=10). После прохождения животными недельного карантина, каждому присваивали индивидуальный номер. Животных распределяли по группам случайным образом. Всего было имплантировано 20 скаффолдов в 10 особей крыс.

Перед операцией животным с целью анестезии внутривенно вводили комбинированный наркоз ZOLETIL 100 (VIRBAC, Франция) в дозировке 10 мг/кг и Ксила (Interchemie, Нидерланды) в дозировке 10 мг/кг, а затем лопаточную

область выстригали от шерсти. Через разрезы размером 1 см тупым способом с помощью ножниц создавались карманы между тканями глубиной 1 см и диаметром 1,5 см (Рисунок 2.5). В образованные карманы помещали заготовленные заранее скаффолды. После этого производили ушивание раны узловыми швами. Санация области раны.



Рисунок 2.5 – Подкожная имплантация скаффолдов

Были определены следующие контрольные временные точки эксперимента: 14-й и 30-й послеоперационный день. В установленные сроки животных подвергали эвтаназии путем гуманного и безопасного метода эвтаназии лабораторных животных из эксперимента при помощи газовой системы CO₂ (ЭВТАНАЙЗЕР-2М, Россия).

Импантированные ранее образцы извлекали и подготавливали для последующих анализов.

С целью определения воспалительной реакции на инородное тело и определения резорбции материалов двух групп скаффолдов мениска выполняли гистологическое исследование образцов после подкожной имплантации скаффолдов крысам через 14 и 30 дней.

Фиксированные в 10%-ом нейтральном забуференном формалине ткани заливали в парафиновые блоки в строгой ориентации, обеспечивающей получение срезов перпендикулярно поверхности кожи. Срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и пикросириусом красным для визуализации коллагеновых волокон. Образцы были оцифрованы с помощью сканера гистологических препаратов Hamamatsu Nanozoomer S20 (Hamamatsu, Япония) в режиме сканирования на увеличении $\times 400$. Цифровые скан-изображения гистологических препаратов были изучены, описаны и оценены методами морфометрии в программе NDP.view 2 (Hamamatsu, Япония).

В каждом препарате оценивали количество кровеносных сосудов в периимпантной ткани, а также полуколичественно оценивались инфильтрация нейтрофилами, макрофагами и клетками инородных тел (0 баллов – отсутствие инфильтрации, 1 балл – единичные клетки в периимпантных тканях, 2 балла – небольшие очаги в периимпантных тканях, 3 балла – крупные очаги или диффузная инфильтрация в периимпантных тканях).

2.3.2. Имплантация скаффолда мениска

В качестве лабораторной модели для имплантации скаффолдов мениска коленного сустава использовали 24 здоровых особей кроликов породы Советская Шиншилла мужского пола весом от 2,5 до 3,5 кг в возрасте 10 месяцев. Животных разделили на 3 группы.

В первой группе (контрольная группа) осуществляли резекцию медиальных менисков коленных суставов на обеих конечностях для изучения процессов дегенерации хрящевой ткани – 12 кроликов – по четыре особи для трех точек выведения 30, 90 и 180 суток.

Во второй группе (экспериментальная группа) производили имплантацию комбинированного скаффолда (ПКЛ + коллагеновые растворы разных типов, сшитые глутаром) в область медиального мениска в обе задние конечности у одной группы.

В третьей группе (экспериментальная группа) на место медиального мениска задней конечности имплантировали ПКЛ-скаффолд.

В рамках решения третьей задачи диссертационной работы перед началом эксперимента кролики каждой основной группы были поделены на две подгруппы. Разделение на подгруппы обусловлено проверкой стабильности коленного сустава после применения разных методик хирургического доступа для осуществления имплантации скаффолда мениска коленного сустава. В первой подгруппе использовали короткий медиальный доступ, а во второй подгруппе длинный парапателлярный доступ с вывихом надколенника.

Перед операцией каждому животному выполняли внутримышечную инъекцию медетомидина гидрохлорида 0,1% (Медитин, Апиценна, Россия) в объеме 0,01–0,15 мл/кг.

Интраоперационно проводили внутривенную антибактериальную терапию Байтрил (Bayer, Германия) из расчета 0,2 мг/кг и противовоспалительную терапию Кетопрофен (Ветпром АД, Болгария) из расчета 3 мг/кг внутривенно болюсно.

Для анальгезии использовали местную анестезию в зону оперативного вмешательства 2% раствором лидокаина гидрохлорида в разведении с раствором NaCl 0,9% в соотношении 1:10.

Описание модели. В первой группе после достижения адекватной седации и анальгезии животного сбривали шерсть в зоне оперативного вмешательства в области обоих коленных суставов. В положении животного на спине, после трехкратной обработки операционного поля 1% раствором йодопирона и спиртовым раствором хлоргексидина в соотношении 1:1, выполняли кожный доступ размером 2 см по медиальной поверхности бедра в области суставной щели (Рисунок 2.6).

Артротомию проводили после визуализации внутренней коллатеральной связки. Тупо с помощью ножниц отделяется капсула сустава. Мобилизацию мягких тканей в этой области возможно также осуществить, отделяя капсулу сустава острыми ножницами от мест прикрепления к бедренным и большеберцовым костям. Для полной визуализации медиального мениска необходимо продвигаться

ножницами в область заднего рога. Далее осуществляется менискэктомия острым скальпелем, начиная с переднего рога мениска, отодвигая ткани мениска от капсулы и до пересечения заднего рога медиального мениска (Рисунок 2.7).



Рисунок 2.6 – Кожный доступ (А) и капсулотомия (Б) по медиальной поверхности бедра



Рисунок 2.7 – Резекция связки переднего рога медиального мениска коленного сустава Советской Шиншиллы

В первой группе не имплантировали скаффолды мениска коленного сустава и после менискэктомии осуществляли послойное ушивание раны. Накладывали вворачивающие швы на кожу и проводили обработку послеоперационной раны спиртовым раствором йодопирона.

Техника имплантации. Во второй и третьей группах после менискэктомии в освободившееся пространство имплантировали изготовленные ранее ПКЛ-скаффолды и комбинированные скаффолды ПКЛ-гидрогель в правую и левую задние конечности, соответственно. При этом в поле зрения всегда оставалась интактная медиальная коллатеральная связка.

Во второй подгруппе для лучшей визуализации задних и передних отделов коленного сустава выполняли кожный доступ размером 4 см по медиальной поверхности бедра в области суставной щели (Рисунок 2.8 А). После чего осуществляли артротомию с последующим вывихом надколенника в латеральную сторону (Рисунок 2.8 Б). При этом медиальная коллатеральная связка оставалась интактна. Далее производят менискэктомию острым скальпелем, начиная с переднего рога мениска, отодвигая ткани мениска от капсулы и до пересечения заднего рога медиального мениска.

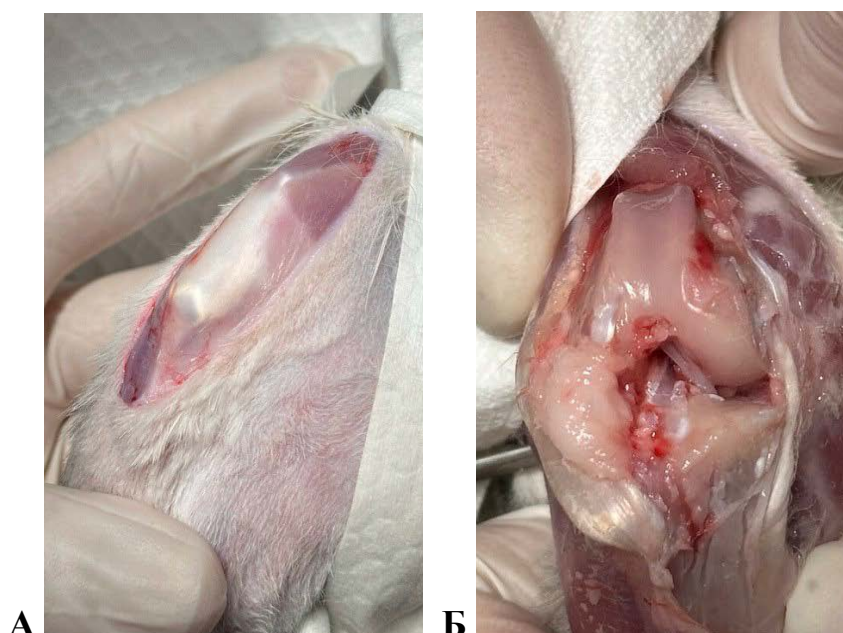


Рисунок 2.8 – Длинный парapatеллярный хирургический доступ на левой задней конечности (А). Вывих надколенника во внешнюю сторону и менискэктомия с сохранением медиальной коллатеральной связки (Б)

Для фиксации имплантата в полости сустава использовано 4 одиночных шва шовным материалом Vicryl 5-0 (Рисунок 2.9, Рисунок 2.10). Первый шов должен быть сформирован кзади от медиальной коллатеральной связки на уровне заднего рога мениска. Второй шов формируется около места нахождения нативного медиального мениска кзади от медиальной коллатеральной связки. Второй шов формируется кпереди от медиальной коллатеральной связки. При формировании швов игла проходит с наружной стороны капсулы и далее продевается через ранее заготовленное отверстие в скаффолде. Узлы при этом фиксируются на оставшейся на плато большеберцовой кости капсуле. Четвертым швом прошивается жировое тело и передняя часть капсулы коленного сустава.

После фиксации скаффолда в обеих подгруппах производили послойное ушивание капсулы сустава. Накладывали вворачивающие швы на кожу и проводили обработку послеоперационной раны спиртовым раствором йодопирона (Рисунок 2.11).

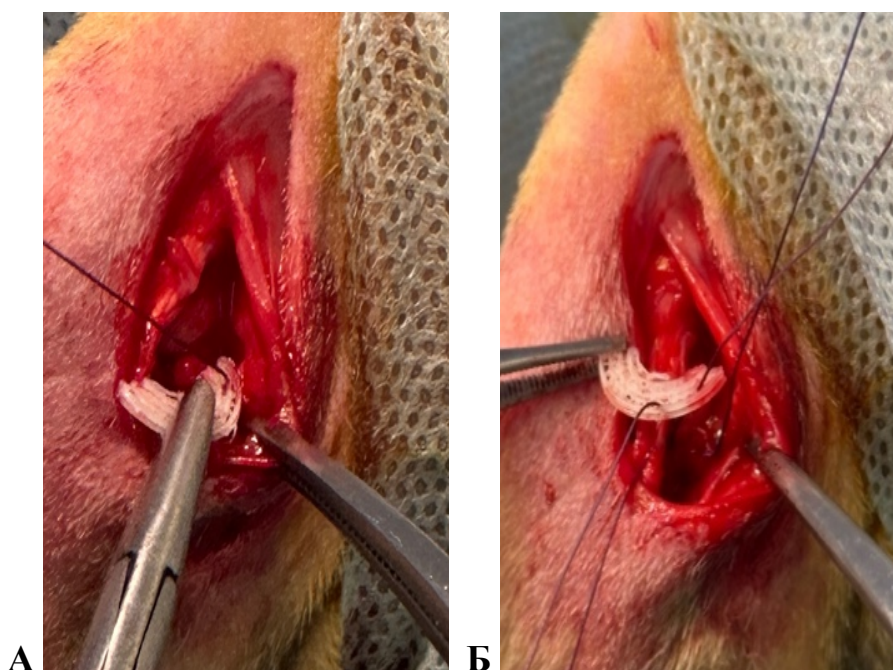


Рисунок 2.9 – Фиксация заднего рога имплантата к задней части капсулы коленного сустава (А) и к связке заднего рога (Б)

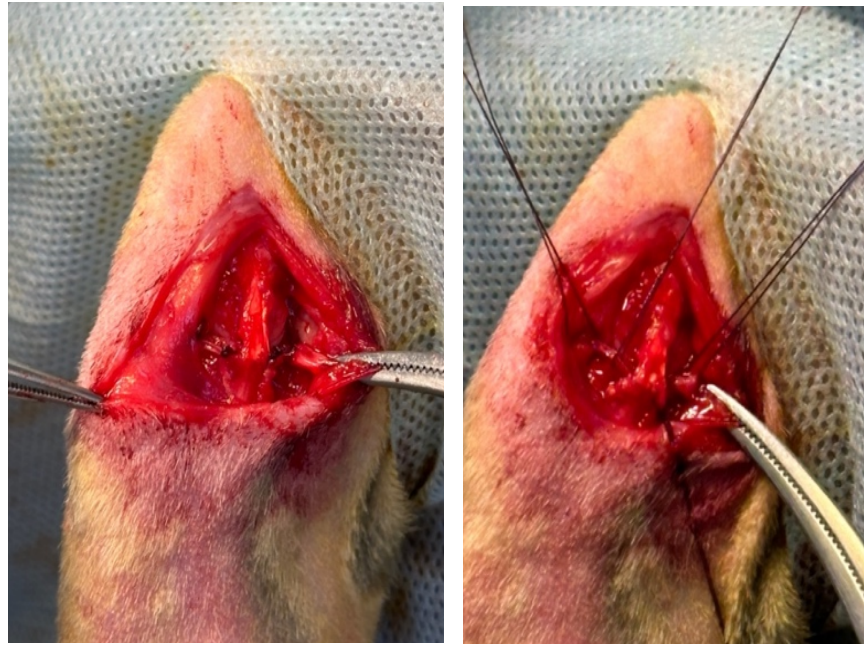


Рисунок 2.10 – Фиксация скаффолда мениска к капсуле при помощи 4 одиночных швов при помощи шовного материала Vicryl 5-0 к нижней части капсулы сустава

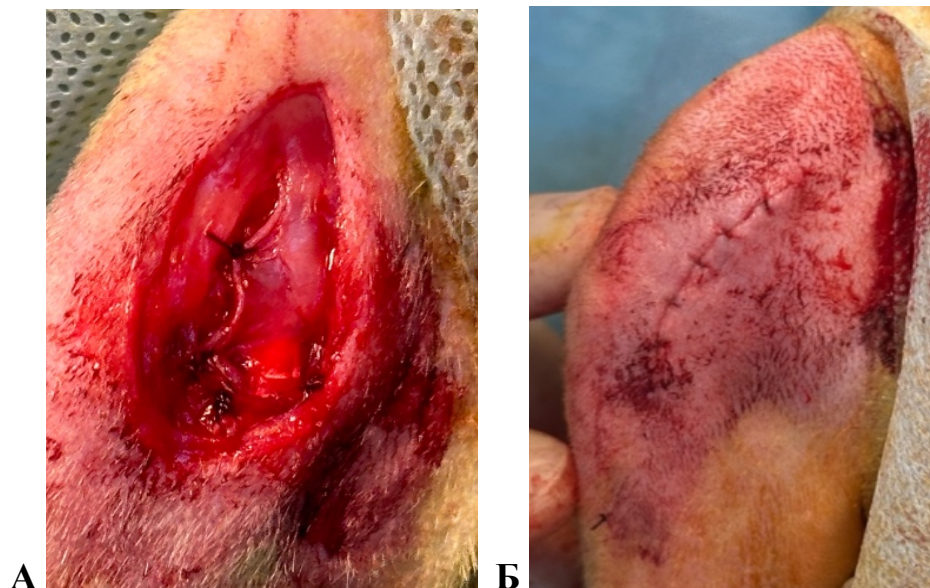


Рисунок 2.11 – Внутренние швы на капсулу (А) и вворачивающие кожные швы (Б)

Оценка качества жизни кроликов после оперативного вмешательства.

Было принято решение разделить оценку качества жизни кроликов на два этапа: ранний и поздний период.

В раннем постимплантационном периоде рассматривали параметры болевого синдрома и воспалительную реакцию на оперативное вмешательство.

На протяжении 14 дней ежедневно проводилась оценка заживления и туалет раны. Производилась обработка раны раствором йодопирона. В качестве антибиотикотерапии использовался раствор Байтрил © 10% из расчета 0,2 мг/кг внутримышечно в течение 10 суток, противовоспалительная терапия проводилась препаратом Кетопрофен 3 мг/кг подкожно. Испытуемые получали корм в достаточном количестве, перемещались в пределах клетки.

Оценку болевого синдрома проводили по классификации шкалы гримас у кроликов (Приложение А) через 1, 3 и 10 дней после операции. Существующая шкала гримас кроликов, которую можно применять в послеоперационном периоде, включает в себя пять пунктов оценивания: форма ноздрей, изменение положения усов, форма и позиция ушей, сужение глазных щелей и сглаживание щек. Каждый из этих параметров оценивали от 0 до 2 баллов. Результаты исследования отмечали в таблице.

В позднем отдаленном периоде акцентировали внимание на возможности передвижения кроликов, выполнения полного объема движений.

Двигательное поведение оценивалось с использованием модифицированной шкалы оценки опорно-двигательного аппарата Бассо, Битти и Бреснахана (шкала BBB). T. Guo et al. (2018) впервые использовали данную классификацию в экспериментах с трансплантацией тканеинженерного конструкта на место дефекта хрящевой ткани кролика [51]. Рассматриваемые параметры могут показать подвижность кролика и его способность опираться на прооперированные конечности в течение раннего постоперационного времени. Оцениваемые параметры с подробным присвоением баллов текущему состоянию кроликов представлены в Приложении Б. Баллы оценивали на трех временных промежутках: через 1, 3 и 10 дней после операции. Результаты исследования отмечали в таблице.

Исследование эксплантов коленного сустава.

МРТ-исследование эксплантатов коленных суставов кроликов. Сканирование коленных суставов кроликов производили на горизонтальном 7T магнитно-резонансном томографе nanoScan (Mediso, Венгрия). Изображения были получены при помощи объемной катушки и градиентной последовательности

с углом поворота 20° , а также при использовании быстрой спин-эхо последовательности в режиме T1 и T2. Финальное разрешение составляло $0,2 \times 0,2 \times 1$ мм. После сканирования эксплантаты помещали в 10%-ый раствор формалина для последующей морфологической и гистологической оценки (Рисунок 2.12).



Рисунок 2.12 – 7Т магнитно-резонансный томограф nanoScan (Mediso, Венгрия) (А) и эксплантат коленного сустава кролика в капсуле МРТ перед исследованием (Б)

Оценку суставных поверхностей по срезам МРТ производили по классификации WORMS (Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score),

изложенной в оригинальной статье авторами C.G. Peterfy et al. (2004) [182] (Приложение В).

Оценка по протоколу WORMS проводилась по 14 параметрам: поражение костного мозга (по типу локального отека), изменение/истончение субхондральной кости, наличие краевых остеофитов, целостность суставного хряща, медиального и латерального менисков, передней и задней крестообразных связок, медиальной и латеральной коллатеральной связок, наличие синовита, внутрисуставных тел, периартикулярных кист, бурсита.

Согласно рекомендациям WORMS, для оценки пяти параметров (отек костного мозга, изменение/истончение субхондральной кости, толщина хряща, периартикулярные кисты и краевые остеофиты) подсчет проводили в каждой из пяти условных областей медиального, центрального и латерального отделов сустава по анатомическим ориентирам [29]. Таким образом, оценка проводилась по 15 условным областям на каждом суставе. Для последующего анализа выводили средние значения на каждую анатомическую зону. Максимальные балльные значения, которые представлены в Приложении В, отображают коленный сустав при тяжелой степени остеоартроза.

Механическое исследование. Постимплантационные скаффолды проходят индентацию на универсальной системе для механических тестов BioMomentum Mach-1 (Biomomentum Inc, Лаваль, Канада). У каждого имплантированного скаффолда проводились измерения модуля сжатия Юнга при индентации в нескольких областях скаффолда мениска (передней, средней и задних частей), имплантированного в коленный сустав кролика (Рисунок 2.13).

Каркас находится в фиксированном положении к капсуле сустава и располагается на плато большеберцовой кости. После проведения механических тестирований эксплантаты помещаются в 10%-ый раствор формалина.

Некоторые имплантаты прошли измерения на растяжение для оценки модуля растяжения Юнга при помощи тисков, в которых зажимали образцы скаффолдов менисков для последующего растяжения.

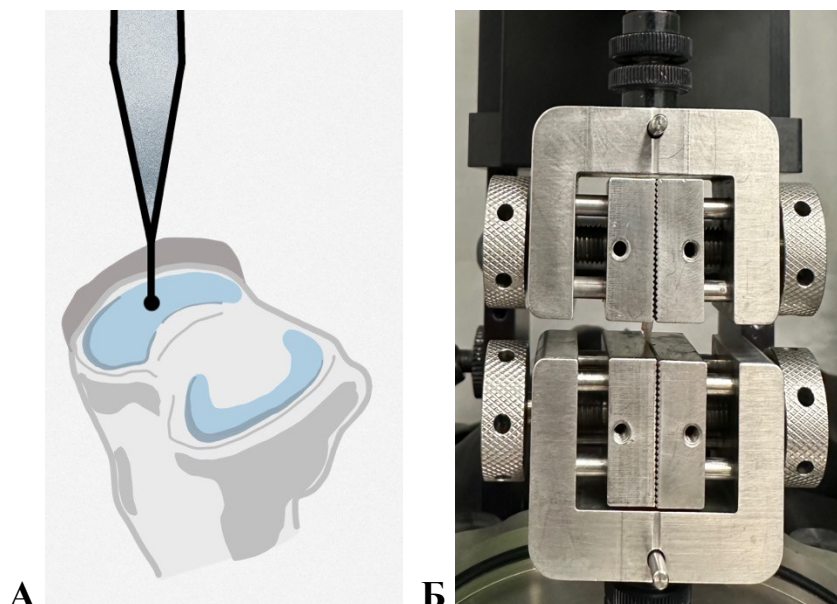


Рисунок 2.13. – Индентация задней части скаффолда мениска коленного сустава кролика. Скаффолд расположен на плато большеберцовой кости и фиксирован внешней стороной к капсуле сустава (А). Образец скаффолда мениска в тисках на универсальной системе для механических тестов BioMomentum Mach-1 (Biomomentum Inc, Лаваль, Канада) (Б)

Гистологическое исследование скаффолдов. Все образцы фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине (Биовитрум, Россия), декальцинировали, обезвоживали, заливали в парафин, получали срезы толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином (Биовитрум, Россия) и сафранином О / метиловым зеленым (Диаэм, Россия) по стандартным протоколам. Препараты изучались при светлопольной микроскопиях в микроскопе Leica DM 4000 B LED с камерой Leica DFC 7000 T. 8. Также гистопрепараты были оцифрованы на гистосканере NanoZoomer S20MD (Hamamatsu, Япония) для проведения морфометрического анализа.

Формирование новой менисковой ткани на скаффолдах оценивалось с помощью классификации Ischida [172]. При этом проводилась полуколичественная оценка трех показателей: интеграция менисковой ткани в скаффолд на границе с капсулой сустава, наличие фиброхондроцитов и степень окрашивания сафранином. Оценивание показателей проводилось вслепую в соответствии с балльной системой, представленной в Приложении Г .

Также в программе NDP.view2 на гистосканах при увеличении 200х оценивали относительную площадь окрашенных сафранином регенератов хряща на 1 мм² гистосреза ткани мениска.

Оценка состояния суставного хряща. Гистологическую оценку деградации суставного хряща оценивали по классификации Mankin после окраски образцов бедренной и большеберцовой костей гематоксилином и эозином. Подробная классификация изложена в Приложении Д. Максимальный балл по шкале Mankin выставлялся за высокую степень дегенерации хряща, а 0 баллов получал образец с нормальным состоянием суставного хряща. При интерпретации результатов лучшим показателем состояния суставного хряща считался эксплантат, который по заданной шкале набирал наименьшее количество баллов.

2.4. Статистическая обработка

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 4.6.1 (разработчик - ООО «Статтех», Россия).

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (М) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ).

В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3).

Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. 95% ДИ для процентных долей рассчитывались по методу Клоппера-Пирсона.

Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение,

выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий).

Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью критерия Краскела-Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

При исследовании гистологических исследований мениска коленного сустава использовали программный пакет GraphPad Prism 10.00 (GraphPad Software, Inc., США). Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро-Уилка ($\alpha > 0,05$). Поиск различий в гистологических показателях балльной оценки проводился с использованием теста Краскела-Уоллиса с последующим тестом множественного сравнения Данна. Межгрупповые различия количественных данных были проанализированы двухфакторным методом ANOVA с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. Результаты статистического анализа были представлены в виде столбчатых диаграмм средних значений и стандартных отклонений для количественных данных и в виде медианных значений и межквартильного диапазона для гистологических параметров оценки.

Р-значения $\leq 0,05$ считались статистически значимыми.

ГЛАВА 3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ СКАФФОЛДОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПАРАМЕТРОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ (ПЕРВЫЙ И ВТОРОЙ ЭТАПЫ)

3.1. Изготовление скаффолдов

После выбора ПКЛ для производства скаффолдов мениска коленного сустава было выполнено экспериментальное исследование по определению температуры деструкции полимера. Результатом исследования являлось определение с подборкой 3D-принтера, температуру экструдера которого возможно настроить на низкие параметры печати, а именно диапазон температур от 100 до 200 градусов Цельсия [37].

В первоначальной модели за основу была взята форма «Колизей» по аналогии с конструкции в оригинальном исследовании G. Bahcesicioglu et al. (2019) [54] (Рисунок 3.1). Однако точность печати после 50 итераций не позволяла сконструировать балки и поры по выбранным ранее параметрам. При использовании СЭМ визуализировались не пропечатанные балки и заполненные ПКЛ поры. Также впоследствии возникло желание создать персонализированные скаффолды с более точной формой и размеров индивидуально под определенного пациента.

Далее рассматривалось несколько форм скаффолда с различной решеткой (расположением балок и пор), представленных на Рисунке 3.2.

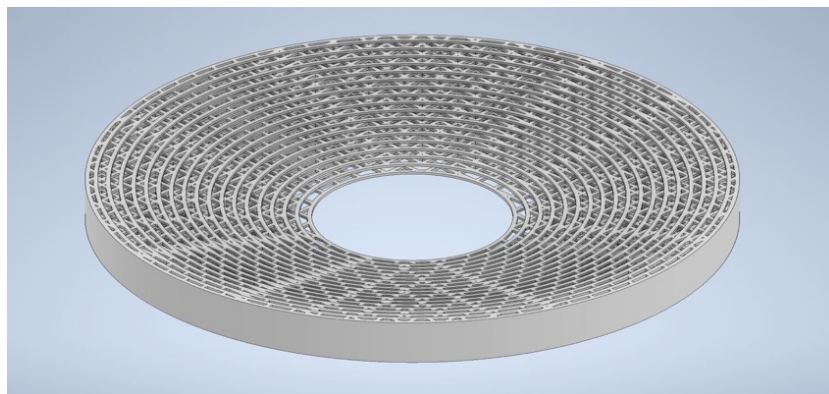


Рисунок 3.1 – Модель скаффолда мениска в форме «Колизей»

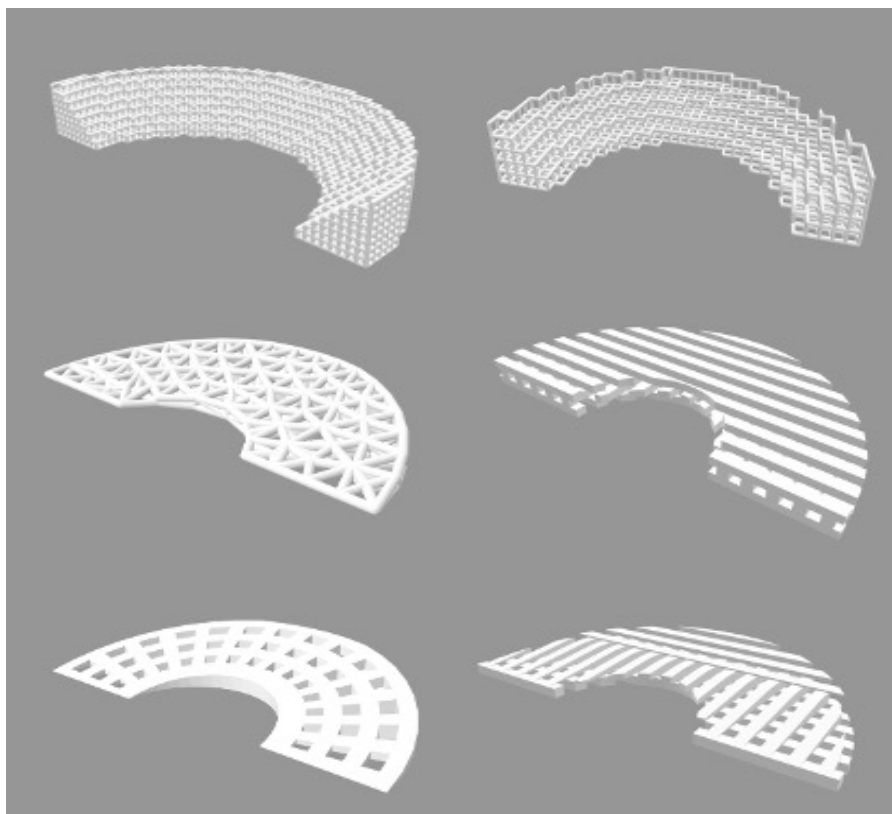


Рисунок 3.2 – Моделированные на компьютерной программе скаффолдов менисков различных ориентаций балок при одинаковой толщине

Последующие компьютерные модели, которые производили по прежде заданным параметрам, а именно 300 мкм толщина балок и 250 мкм толщина пор, имели разную архитектуру. Однако печать подобных конструкций не представлялась возможной, и при приближении под СЭМ отмечалась заполненность пор ПКЛ (Рисунок 3.3)

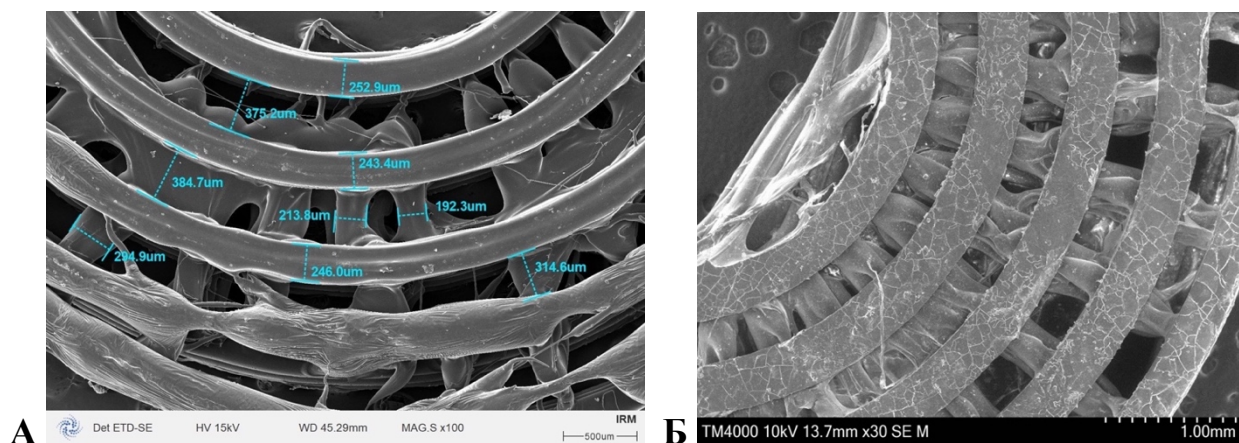


Рисунок 3.3 – Первые распечатанные скаффолды мениска на СЭМ (А) с разной толщиной балок и (Б) заполненными порами ПКЛ

Как следствие, выбор модели остановился на варианте модели, представленной на Рисунке 3.4.

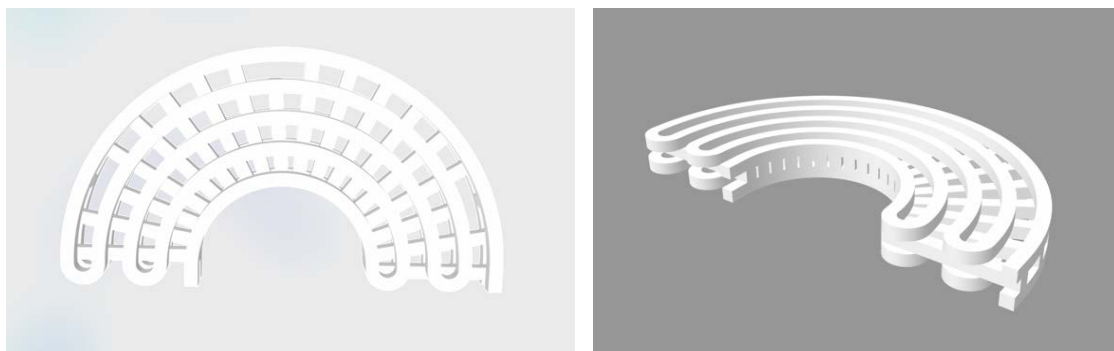


Рисунок 3.4 – Конечный вид компьютерной 3D-модели скаффолда

Для последующего испытания выбранной архитектуры модели каркаса мениска коленного сустава было произведено по 10 итераций на каждый тип модели с температурным шагом в 10 градусов – от 130 до 170 градусов Цельсия.

Результаты измерения скаффолдов, напечатанных на 3D-принтере при температуре 130 и 140 градусов Цельсия, по параметрам сопоставимы при сравнении с данными, полученными при индентации нативного мениска кролика. Пропечатанные балки скаффолда представлены на Рисунке 3.5, сравнительная характеристика значений модуля Юнга от температуры печати скаффолда – на Рисунке 3.6 и в Таблице 3.1.

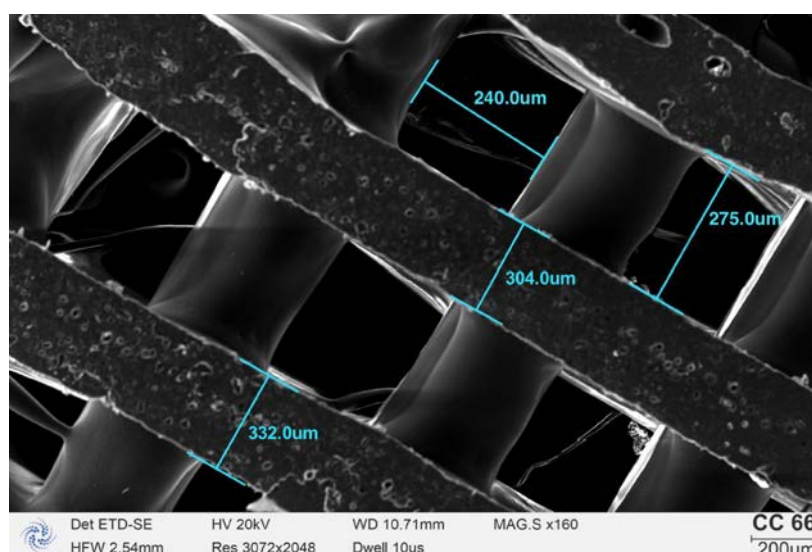


Рисунок 3.5 – Размеры балок и пор на СЭМ

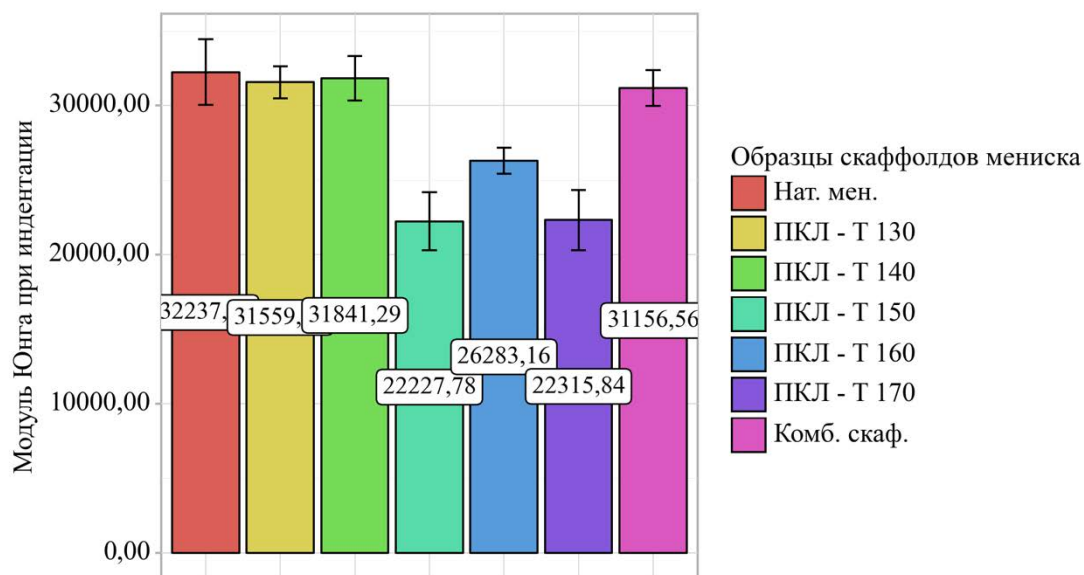


Рисунок 3.6 – Зависимость изменения параметров жесткости материала от температуры печати

Таблица 3.1 – Средние значения модуля Юнга при сжатии образцов скаффолда ПКЛ при различной температуре, образцов скаффолда ПКЛ-гидрогель и образцов нативного мениска (в МПа)

Образцы скаффолдов мениска	Модуль Юнга при индентации, МПа			p
	M ± SD	95% ДИ	n	
Нативный мениск КС кролика	32237,19 ± 3070,00	30041,05 – 34433,33	10	$< 0,001^*$ $p_{\text{Комб.скаф.} - \text{ПКЛ Т 150}} < 0,001$ $p_{\text{Комб.скаф.} - \text{ПКЛ Т 160}} < 0,001$ $p_{\text{Комб.скаф.} - \text{ПКЛ Т 170}} < 0,001$ $p_{\text{Нат.мен. кр.} - \text{ПКЛ Т 150}} < 0,001$ $p_{\text{Нат. мен.} - \text{ПКЛ Т 160}} < 0,001$ $p_{\text{Нат. мен.} - \text{ПКЛ Т 170}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 130} - \text{ПКЛ Т 150}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 130} - \text{ПКЛ Т 160}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 130} - \text{ПКЛ Т 170}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 140} - \text{ПКЛ Т 150}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 140} - \text{ПКЛ Т 160}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 140} - \text{ПКЛ Т 170}} < 0,001$ $p_{\text{ПКЛ Т 150} - \text{ПКЛ Т 160}} = 0,003$ $p_{\text{ПКЛ Т 160} - \text{ПКЛ Т 170}} = 0,004$
ПКЛ-скаффолд при 130 °C	31559,29 ± 1501,86	30484,92 – 32633,66	10	
ПКЛ-скаффолд при 140°C	31841,29 ± 2091,12	30345,39 – 33337,19	10	
ПКЛ-скаффолд при 150°C	22227,78 ± 2714,38	20286,03 – 24169,53	10	
ПКЛ-скаффолд при 160°C	26283,16 ± 1224,48	25407,22 – 27159,10	10	
ПКЛ-скаффолд при 170°C	22315,84 ± 2830,08	20291,32 – 24340,36	10	
Комбинированный скаффолд	31156,56 ± 1678,26	29956,00 – 32357,11	10	

Полученные данные оценки модуля Юнга при индентации в зависимости от образца скаффолда мениска позволили установить статистически значимые различия ($p < 0,001$) (используемый метод: F–критерий Фишера).

После модификации скаффолдов коллагеновыми гидрогелями модуль Юнга соответствовал образцам ПКЛ-скаффолда на температурах 130 и 140 градусов Цельсия, что сопоставимо с показателями модуля упругости нативного мениска ($p < 0,001$).

При оценке распределения коллагеновых гидрогелей на СЭМ (Рисунок 3.7) были отмечены следующие особенности: во внешней части скаффолда отмечались фибриновые структуры, которые покрывали внешние балки (Рисунок 3.8). Во внутренней структуре на балках отчетливых разливованных структур не отмечалось (Рисунок 3.9). Некоторые поры также были пропитаны раствором коллагена I и II типов.

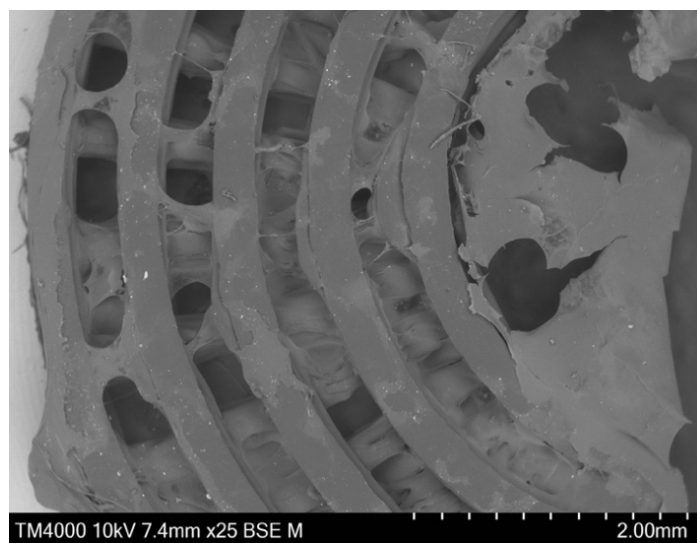


Рисунок 3.7 – Коллагеновые гидрогели I и II типа между поликапролактоновыми балками на СЭМ

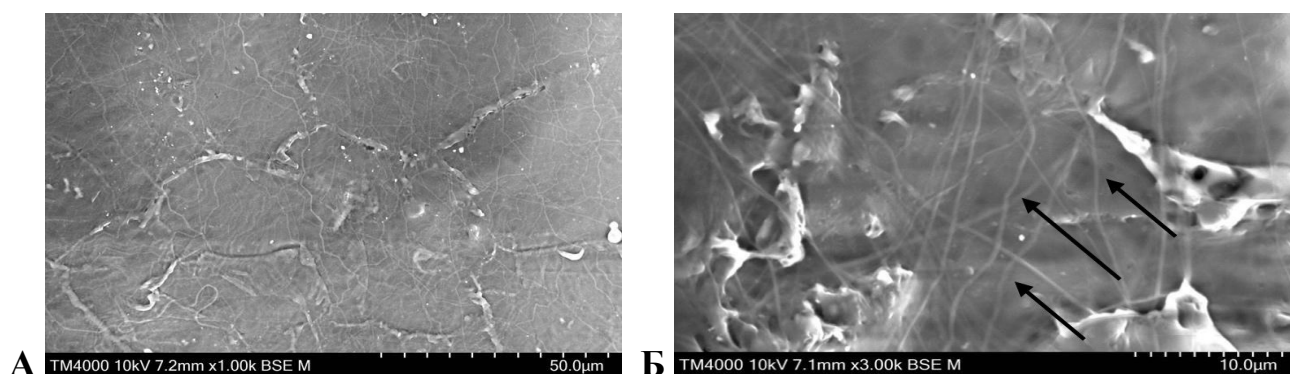


Рисунок 3.8 – Фибриллярные структуры коллагенового волокна I типа (отмечено стрелками) на балках поликапролактонового скаффолда I типа на увеличении $\times 300$ (А) и $\times 1000$ (Б)

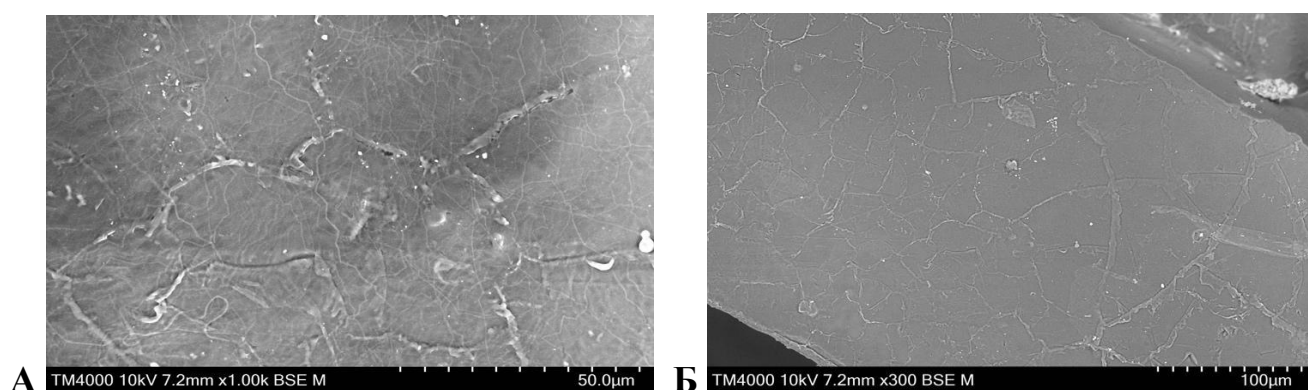


Рисунок 3.9 – Внешняя поликапролактоновая балка, покрытая коллагеном II типа на увеличении $\times 300$ (Б) и $\times 1000$ (А)

3.2. Определение гидрофильности

Смачиваемость скаффолдов ПКЛ и комбинированных скаффолдов (основа ПКЛ с коллагеновыми гидрогелями, сшитыми глютаром) оценивали путем измерения угла смачивания дистиллированной водой. Помимо этого, были проведены замеры скаффолдов после помещения их в физиологический раствор. Результаты предварительно обработанных чистых ПКЛ-скаффолдов, комбинированных скаффолдов, сшитых и несшитых глютаром, представлены по временным промежуткам в Таблице 3.2 и на Рисунках 3.10–3.14. Согласно представленной таблице, при анализе контактного угла смачивания (КУС) на 1-й секунде, на 5-й секунде, на 10-й секунде в зависимости от типа скаффолда были выявлены существенные различия ($p = 0,008$, $p = 0,008$, $p < 0,001$ соответственно)

(используемые методы: Критерий Краскела–Уоллиса, Критерий Краскела–Уоллиса, F–критерий Фишера).

Таблица 3.2 – Средние значения угла смачивания в зависимости от времени нахождения капли деионизированной воды на скаффолдах ПКЛ и ПКЛ-гидрогель в сухом виде и смоченном в растворе PBS

КУС	Типы скаффолдов	КУС			p
		$M \pm SD / Me$	95% ДИ / $Q_1 - Q_3$	n	
1-я сек.	Скаффолд ПКЛ	84,12	84,09 – 85,38	3	0,016* $p_{\text{Комб.скаф.} + \text{PBS} - \text{ПКЛ}} = 0,013$
	Скаффолд ПКЛ + PBS	79,60	78,89 – 80,31	3	
	Комбинированный скаффолд	72,09	70,39 – 72,74	3	
	Комбинированный скаффолд + PBS	22,79	20,01 – 24,16	3	
5-я сек.	Скаффолд ПКЛ	84,14	84,14 – 85,87	3	0,016* $p_{\text{Комб.скаф.} + \text{PBS} - \text{ПКЛ}} = 0,013$
	Скаффолд ПКЛ + PBS	78,75	77,60 – 79,89	3	
	Комбинированный скаффолд	72,15	70,42 – 72,78	3	
	Комбинированный скаффолд + PBS	20,46	18,31 – 23,90	3	
10-я сек.	Скаффолд ПКЛ	$85,62 \pm 2,50$	79,42 – 91,82	3	< 0,001* $p_{\text{Комб.скаф.} - \text{Комб. скаф.} + \text{PBS}} < 0,001$ $p_{\text{Комб.скаф.} - \text{ПКЛ}} = 0,026$ $p_{\text{Комб.скаф.} + \text{PBS} - \text{скаффолд ПКЛ}} < 0,001$ $p_{\text{Комб. скаф.} + \text{PBS} - \text{скаффолд ПКЛ} + \text{PBS}} < 0,001$
	Скаффолд ПКЛ + PBS	$77,07 \pm 3,97$	67,22 – 86,92	3	
	Комбинированный скаффолд	$71,32 \pm 2,41$	65,33 – 77,31	3	
	Комбинированный скаффолд + PBS	$22,33 \pm 7,98$	2,51 – 42,16	3	

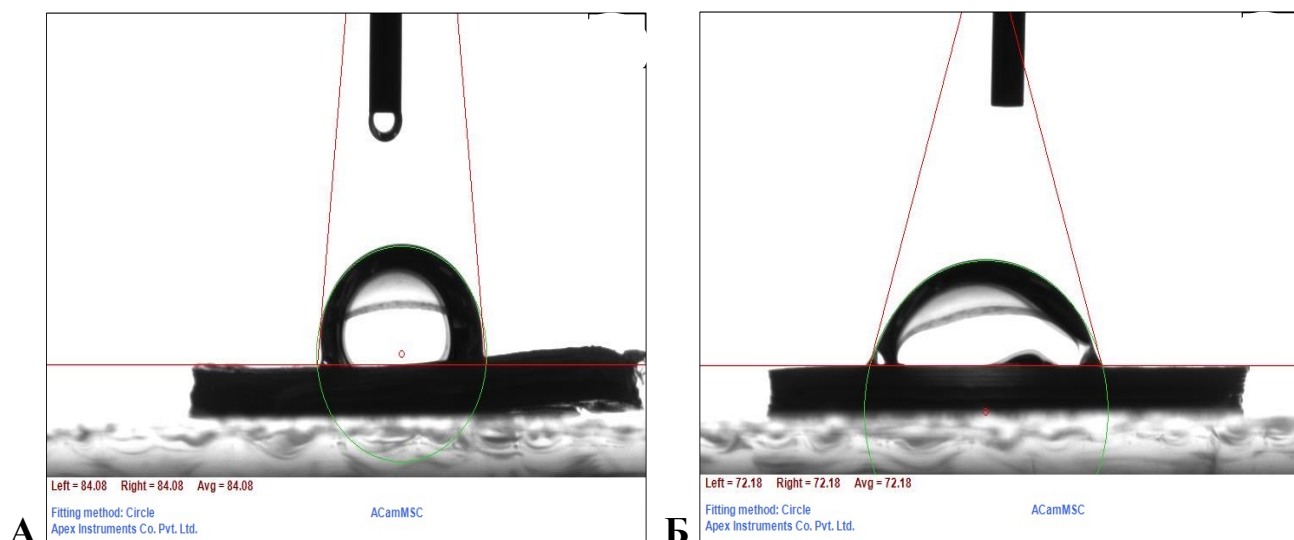


Рисунок 3.10 – КУС на ПКЛ-скаффолде в сухом виде (А) и после 30 минут нахождения в физиологическом растворе (Б)

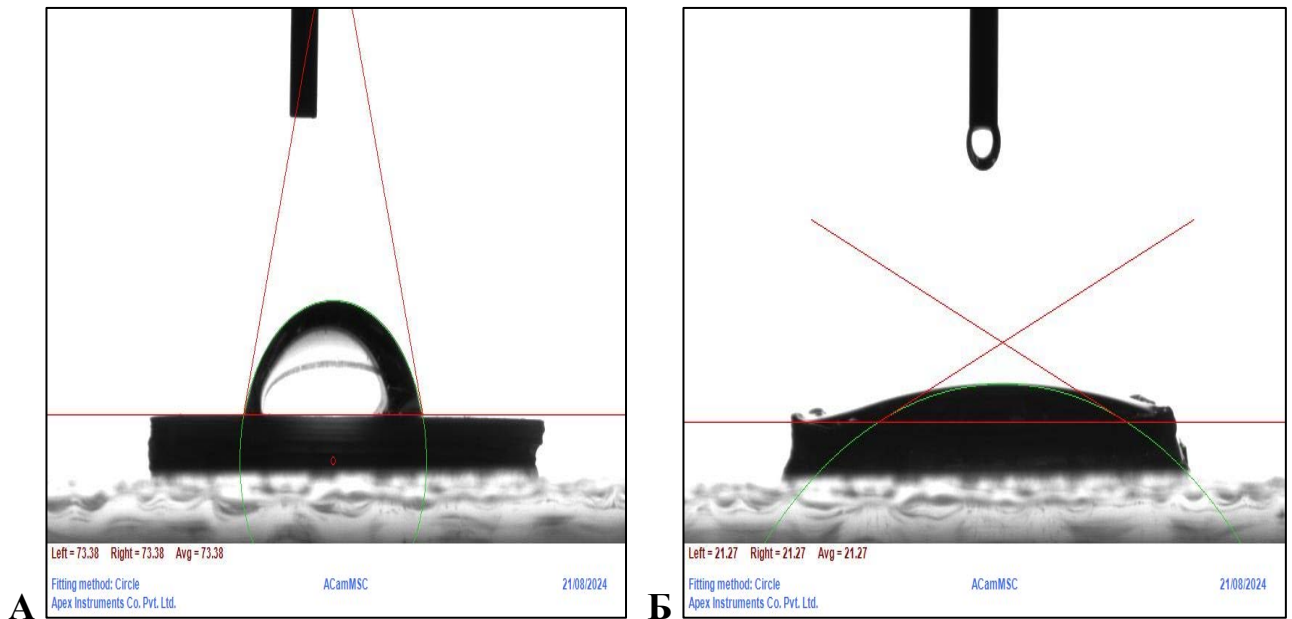


Рисунок 3.11 – КУС на комбинированном скаффолде в сухом виде (А) и после 30 минут нахождения в физиологическом растворе (Б)

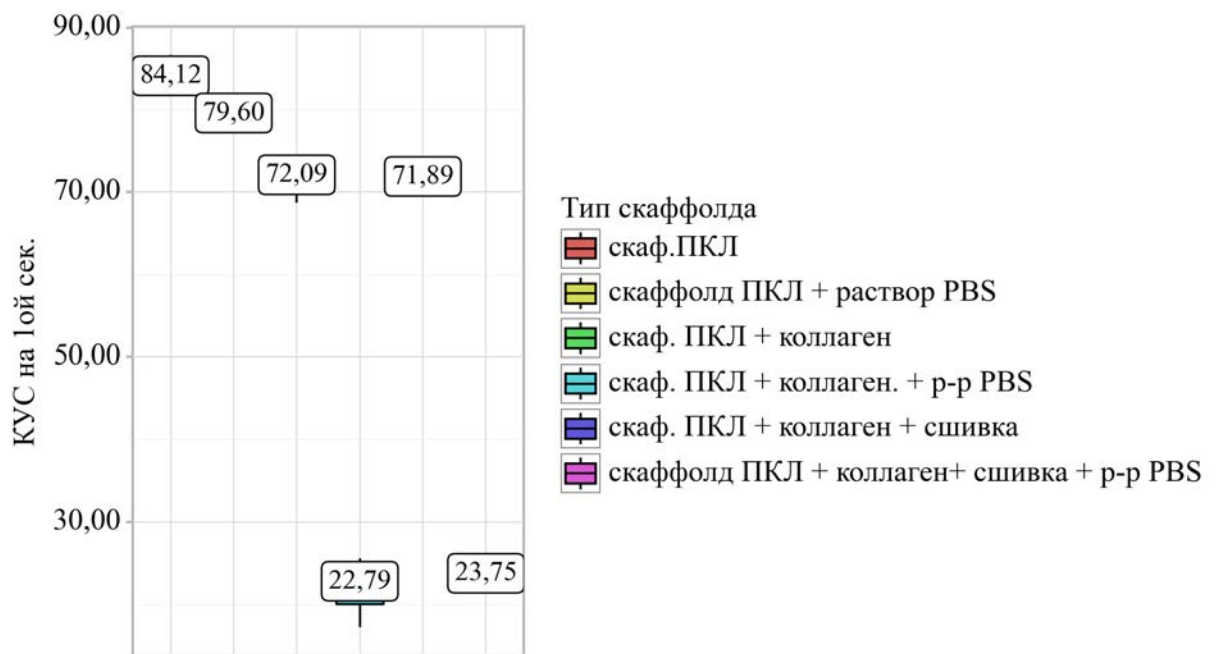


Рисунок 3.12 – Средние значения КУС капли дистиллированной воды на 1-й секунде на скаффолдах ПКЛ и в комбинации с коллагеном в сшивке глютаром и без сшивки в сухом виде и после 30 минут нахождения в физиологическом растворе

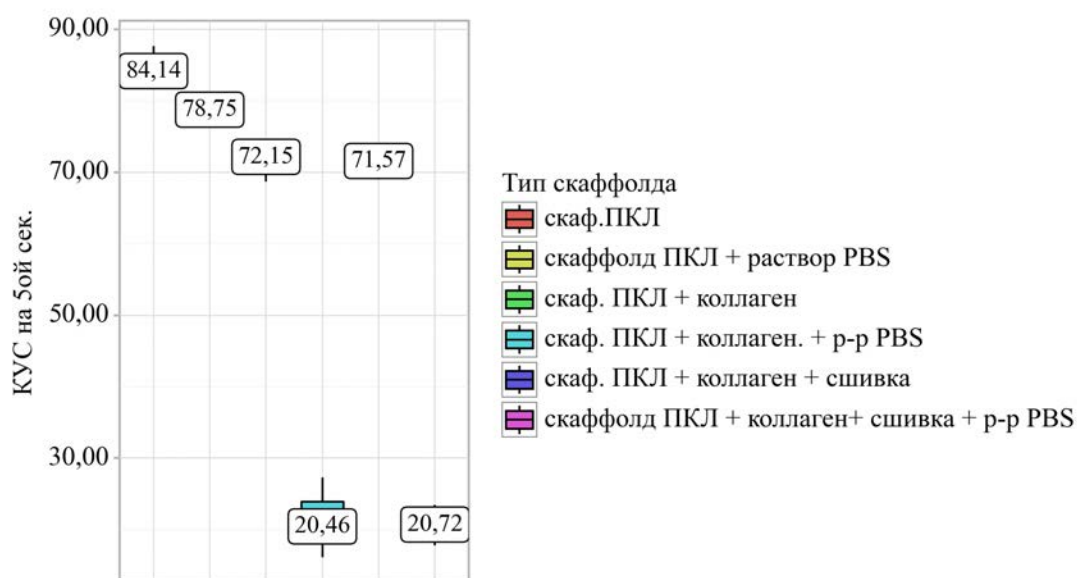


Рисунок 3.13 – Средние значения КУС капли дистиллированной воды на 5-й секунде на скаффолдах ПКЛ и в комбинации с коллагеном в сшивке глютаром и без сшивки в сухом виде и после 30 минут нахождения в физиологическом растворе

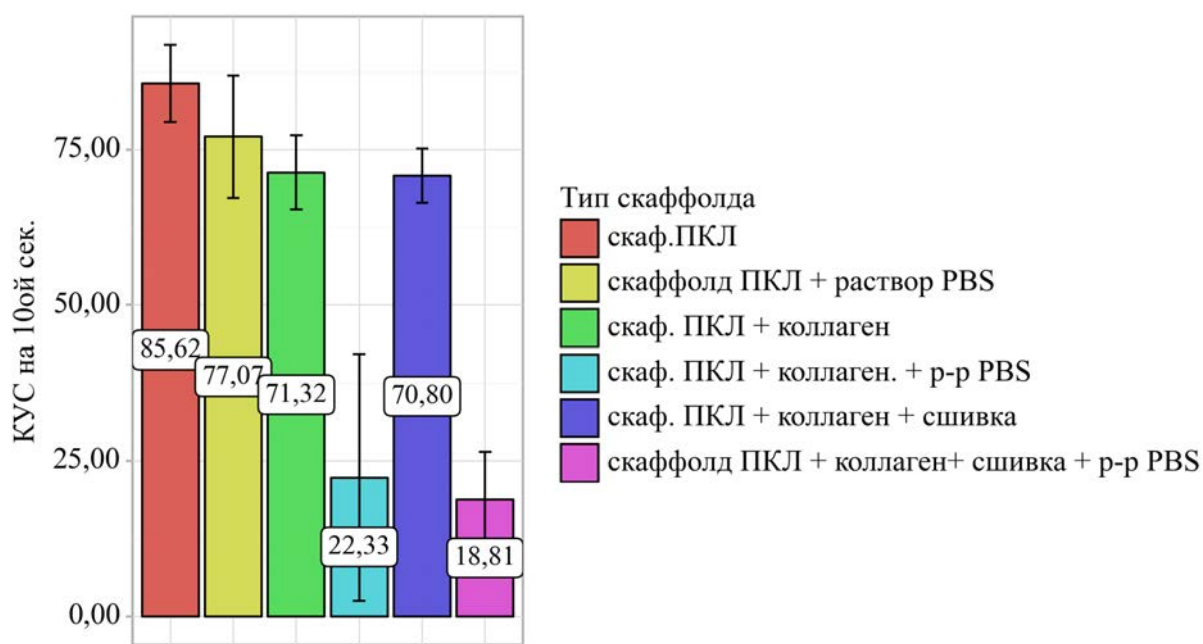


Рисунок 3.14 – Средние значения КУС капли дистиллированной воды на 10-й секунде на скаффолдах ПКЛ и в комбинации с коллагеном в сшивке глютаром и без сшивки в сухом виде и после 30 минут нахождения в физиологическом растворе

3.3. Определение цитотоксичности на фибробластах человека

Для дальнейшего определения возможности клеток расти и размножаться на произведенных скаффолдах был произведен тест на цитотоксичность.

После 72 часов культивирования большинство клеток на комбинированных скаффолдах, сшитых и несшитых глютаровым альдегидом, и на скаффолдах ПКЛ остались жизнеспособными.

Отмечается уменьшение количества клеток на ПКЛ-скаффолде на 57% за 24 часа и на 84% от изначального числа клеток через 72 часа. На скаффолдах с коллагеновыми гидрогелями, не сшитыми глютаровым альдегидом, количество клеток увеличилось на 17,1% за 24 часа. Увеличение количества фибробластов на данном виде скаффолда составила на третьи сутки 88% (Таблица 3.3, Рисунки 3.15 и 3.16).

Таблица 3.3 – Значения количества жизнеспособных клеток через 24 часа и 72 часа после подсадки клеток (в %)

Показатели	Категории	Кол-во клеток в %			p
		M ± SD / Me	95% ДИ / Q ₁ – Q ₃	n	
Кол-во клеток на скаффолде за 24 часа	Скаффолд ПКЛ	43,15	39,29 – 47,26	6	0,002* p _{ПКЛ + кол.– ПКЛ} = 0,002 p _{ПКЛ + кол. + сшивка – ПКЛ} = 0,035
	Скаффолд ПКЛ + коллагеновые гидрогели	117,16	115,45 – 118,48	6	
	Скаффолд ПКЛ + коллагеновые гидрогели + сшивка глютаром	110,03	108,88 – 113,57	6	
Кол-во клеток на скаффолде за 72 часа	Скаффолд ПКЛ	16,19 ± 1,85	14,25 – 18,12	6	< 0,001* p _{ПКЛ – ПКЛ + коллаген} < 0,001 p _{ПКЛ – ПКЛ + кол. + сшивка} < 0,001
	Скаффолд ПКЛ + коллагеные гидрогели	188,72 ± 37,40	149,47 – 227,97	6	
	Скаффолд ПКЛ + коллагеновые гидрогели + сшивка глютаром	165,82 ± 12,76	152,42 – 179,21	6	
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)					

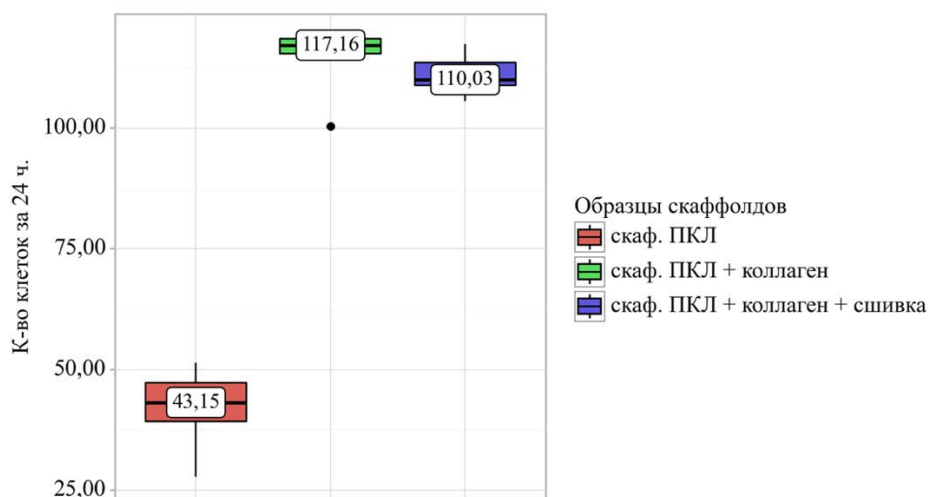


Рисунок 3.15 – Количество клеток на скаффолдах за 24 часа в зависимости от образца скаффолда

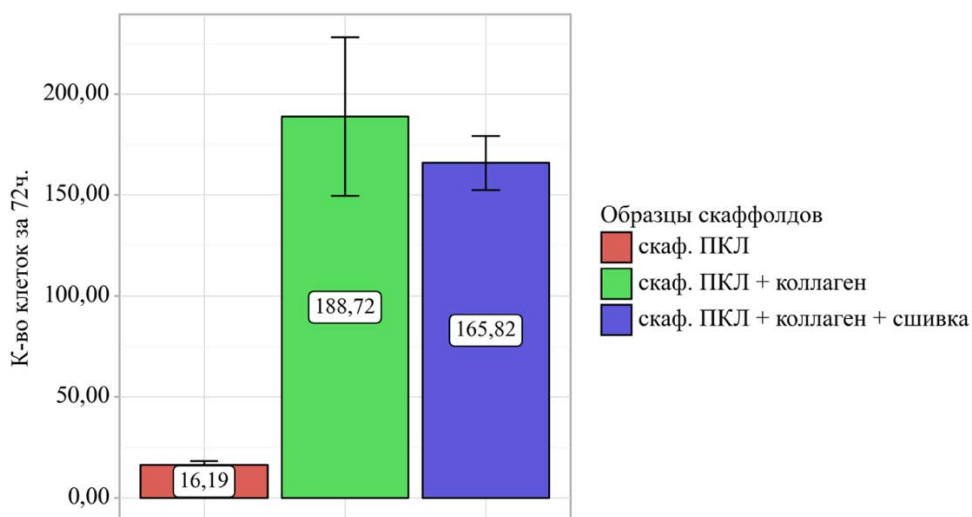


Рисунок 3.16 – Анализ количества клеток на скаффолдах за 72 часа в зависимости от образца скаффолда

На комбинированных скаффолдах, сшитых глутаром, количество клеток увеличилось на 10% спустя 24 часа ($p=0,035$) и на 65% спустя 72 часа ($p < 0,001$) нахождения на скаффолде. Оба комбинированных скаффолда представляли интерес, однако только комбинированный скаффолд, сшитый с использованием глутаральдегида, был включен в последующие исследования *in vivo* наряду с ПКЛ-скаффолдом. Таким образом, сшивка глутаровым альдегидом позволяла увеличить время нахождения коллагеновых гидрогелей на полимерных скаффолдах.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИМПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДА ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ (ТРЕТИЙ И ЧЕТВЕРТЫЙ ЭТАПЫ)

4.1. Воспалительная реакция после подкожной имплантации

Через две недели после подкожной имплантации скаффолда из ПКЛ отмечалось наличие полостей прямоугольной формы 500 мкм на 500 мкм, соответствующих фрагментам полимерного биоматериала (материал растворяется во время пробоподготовки). Участок имплантации находился между дермой, мышцами спины и подкожно-жировой клетчаткой. В пространства между фрагментами скаффолда врастала грануляционная ткань с умеренным количеством фибробластов с коллагеновыми волокнами. При окраске пикросириусом красным отмечалось, что матрикс между фрагментами материала был представлен очень тонкими пучками коллагеновых волокон. Нейтрофильная и макрофагальная реакции были слабовыраженными, клетки инородных тел были единичные. Периимплантные ткани не содержали признаков интенсивной васкуляризации. Соединительнотканная капсулы еще не образовалась, но по периферии от материала обнаруживались фибробласты с ориентацией, параллельной текстуре имплантата (Рисунок 4.1 А, Б; Рисунок 4.2 А, Б).

На этом же временном сроке после подкожной имплантации скаффолдов из ПКЛ и коллагеновых волокон (без применения глутаральдегида) также определялись полости от фрагментов имплантата. Общий размер имплантата составлял 5–10 мм. Это различие определялось несимметричной дисковой формой имплантата, из-за которого общий размер менялся в зависимости от удаления среза от центра биоматериала. Внутри пространств между фрагментами – полнокровные тонкостенные капилляры, грануляционная ткань из толстых пучков коллагеновых волокон, которые заполняли пространства более обширно, чем в группе чистого ПКЛ. При окраске пикросириусом красным определялся смешанный состав коллагеновых волокон между фрагментами скаффолда: отдельные пучки коллагена были очень толстыми и имели ненаправленную извитую форму, что указывало на

их экзогенное происхождение. Множественные макрофаги определялись на границе глубокого и среднего слоев имплантата. Отмечались единичные клетки инородных тел. Соединительнотканная капсула вокруг материала на границе с подкожно-жировой клетчаткой состояла из слоя плотно упакованных параллельных коллагеновых волокон и капилляров (Рисунок 4.1 В, Г; Рисунок 4.2 В, Г).

На этом же временном сроке после подкожной имплантации скаффолдов из ПКЛ и сшитых коллагеновых волокон (с применением глутаральдегида) определялся участок имплантации с полостями, указывающими на фрагменты скаффолда. В пространствах между фрагментами определялась плотная соединительная ткань, которая была инфильтрирована макрофагами, а также содержала фибробласты, капилляры и сосуды малого калибра. При окраске пикросириусом красным только в этой группе в пространствах между фрагментами материала визуализировались плотно упакованные коллагеновые волокна нормально толщины. В участках прорастаний определяются признаки биodeградации ПКЛ. Вокруг материала – признаки созревающей соединительнотканной капсулы (Рисунок 4.1 Д, Е; Рисунок 4.2 Д, Е).

Через **месяц после подкожной имплантации** скаффолда из ПКЛ (без применения коллагена) фрагменты полимерного материала сливались в более крупные пространства, но сохраняли свою прямоугольную форму и размер около 500 мкм на 500 мкм. Соединительная ткань между фрагментами материала была очень рыхлой и слабо васкуляризированной. При окраске пикросириусом красным определялось, что она состояла из разрозненных и разнонаправленных пучков коллагеновых волокон. Воспалительная реакция была преимущественно макрофагальной: макрофаги окружали фрагменты материала, рядом отмечались клетки инородных тел. Соединительнотканная капсула вокруг была крайне тонкой, состояла из 2–3 слоев фибробластов и тонких пучков коллагеновых волокон. Инфильтрация лейкоцитами была очаговой и редкой (Рисунок 4.3 А, Б; Рисунок 4.4 А, Б).

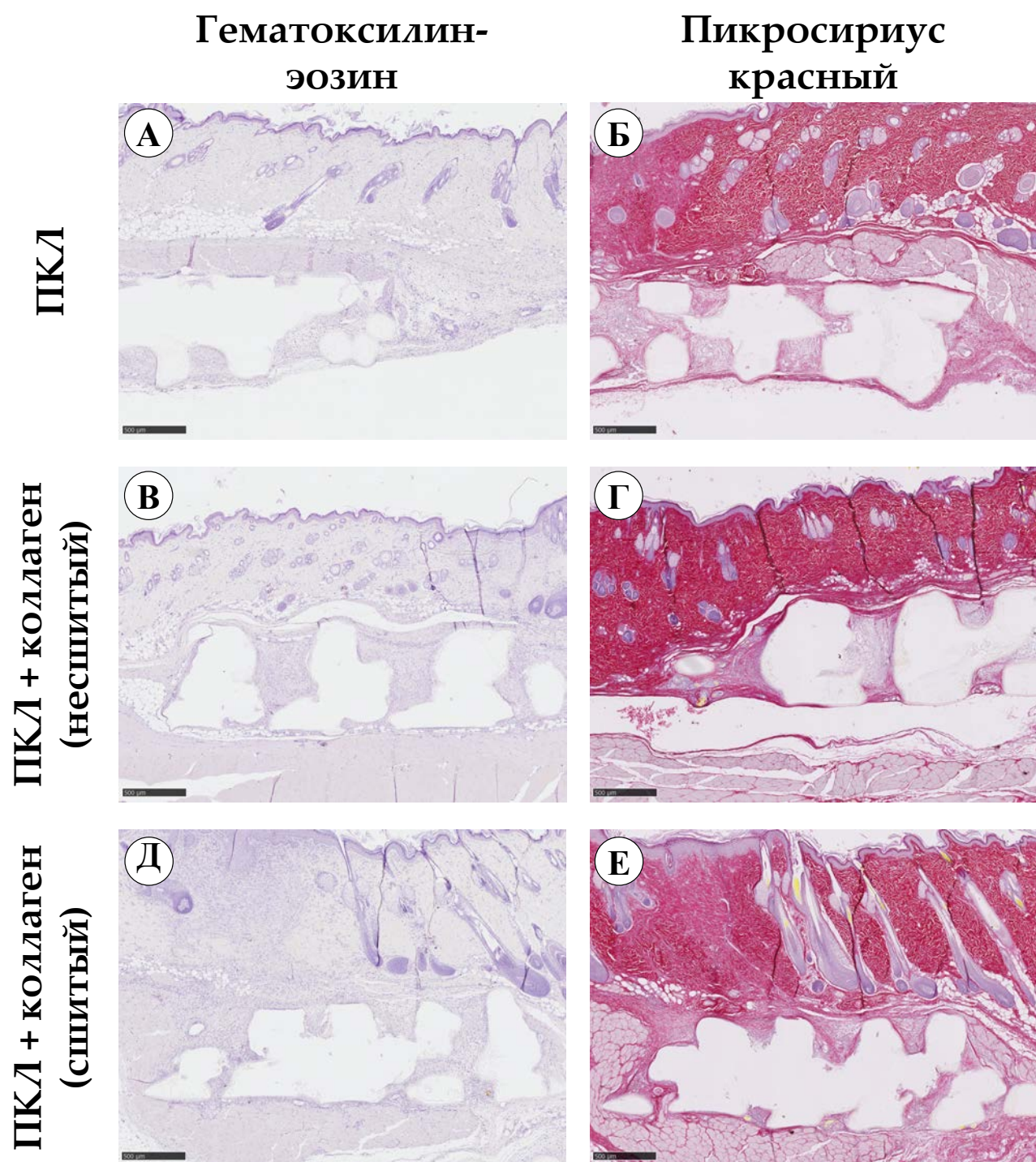


Рисунок 4.1 – Участки имплантаций ПКЛ-скаффолдов без коллагена (А, Б), ПКЛ-скаффолдов с коллагеном (В, Г) и ПКЛ-скаффолдов со сшитым коллагеном (Д, Е), 14 дней после имплантации. Окраски гематоксилином-эозином и пикросириусом красным, увеличение $\times 50$

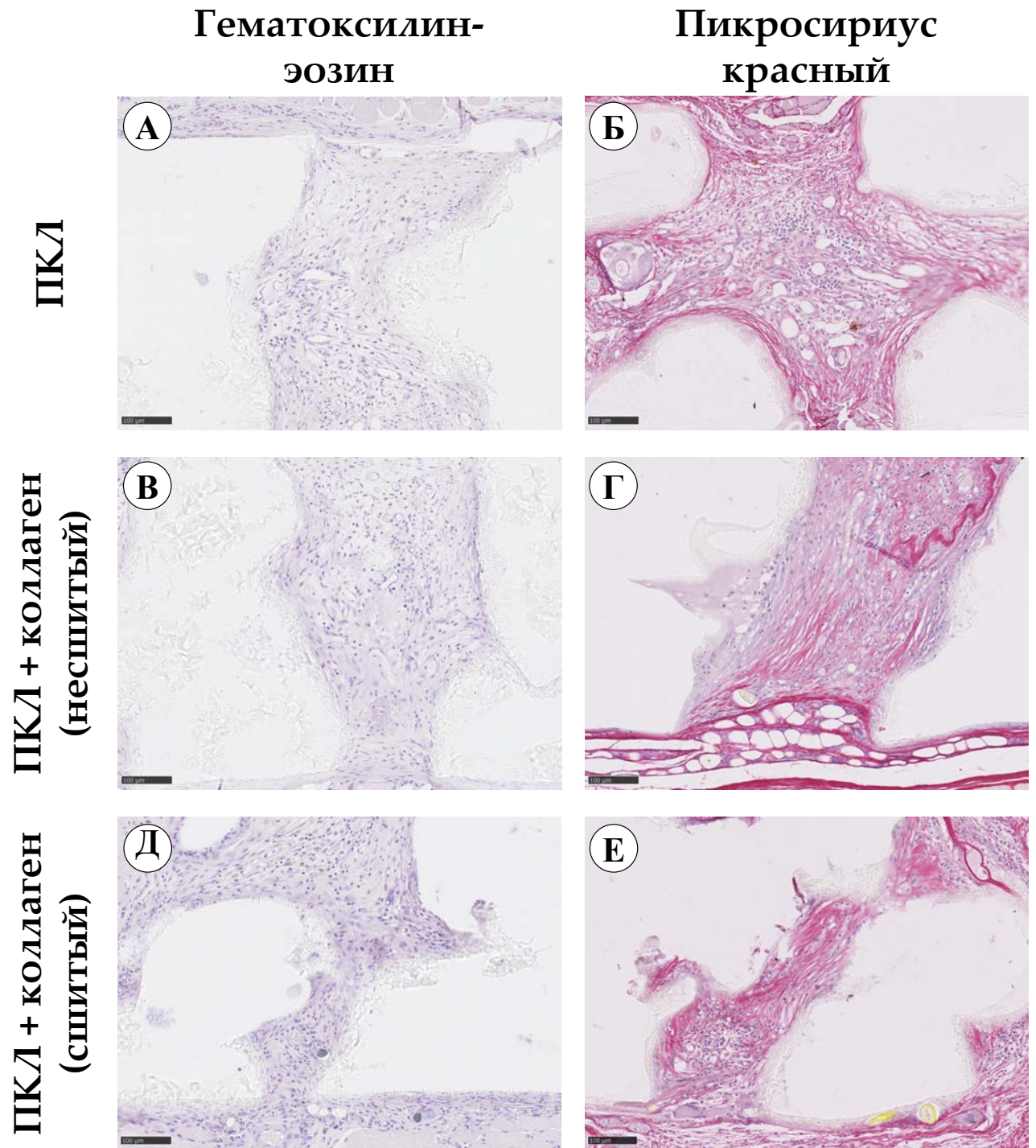


Рисунок 4.2 – Участки имплантаций ПКЛ-скаффолдов без коллагена (А, Б), ПКЛ-скаффолдов с коллагеном (В, Г) и ПКЛ-скаффолдов со сшитым коллагеном (Д, Е), 14 дней после имплантации. Окраски гематоксилином-эозином и пикросириусом красным, увеличение $\times 200$

На этом же временном сроке после подкожной имплантации скаффолдов из ПКЛ и коллагеновых волокон (без применения глутаральдегида) определялись фрагменты материала, неплотная рыхлая соединительная ткань во всей толще пространств между фрагментами материала, богатая васкуляризация. При окраске пикросириусом красным отмечалось, что в этой группе коллагеновые волокна окружали отдельные фрагменты материала, создавая регионы параллельной упаковки. Зрелая соединительнотканная капсула состояла из примерно 10 пучков параллельно идущих коллагеновых волокон и была значительно толще, чем в других группах. Разрастание капсулы указывает на процесс фиброза. Вокруг самого материала не было клеток инородных тел (Рисунок 4.3 В, Г; Рисунок 4.4 В, Г).

На этом же временном сроке после подкожной имплантации скаффолдов из ПКЛ и сшитых коллагеновых волокон (с применением глутаральдегида) определялся участок материала, окруженный тонкой соединительнотканной капсулой. В пространствах между фрагментами – очаги прорастания соединительной ткани с разной степенью плотности. При окраске пикросириусом красным было выявлено, что коллагеновые волокна окружали материал, повторяя его текстуру. В отдельных регионах плотность коллагена была высокой, коллагеновые волокна образовывали заметные фокусы плотной упаковки, в которых обнаруживались макрофаги. Вероятно, это были фокусы резорбции экзогенного коллагена. В глубине между фрагментами плотность макрофагов и лейкоцитов выше. В периимплантных тканях определяются участки выраженной васкуляризации и макрофагальной реакции. Отмечаются признаки интенсивной биодеградации скаффолда (Рисунок 4.3 Д, Е; Рисунок 4.4 Д, Е).

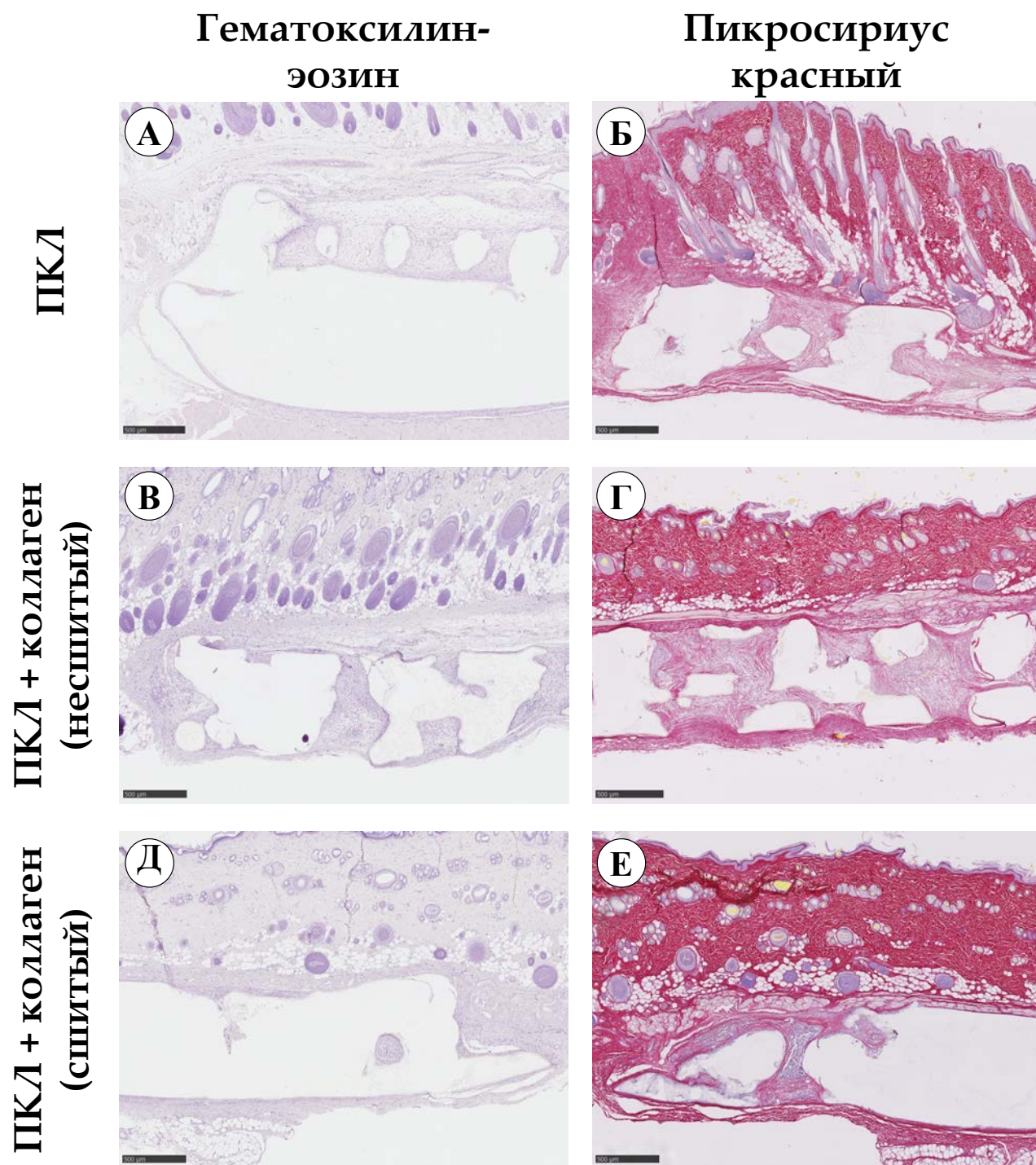


Рисунок 4.3 – Участки имплантаций ПКЛ-скаффолдов без коллагена (А, Б), ПКЛ-скаффолдов с коллагеном (В, Г) и ПКЛ-скаффолдов со сшитым коллагеном (Д, Е), 1 месяц после имплантации.
Окраски гематоксилином-эозином и пикросириусом красным, увеличение $\times 50$

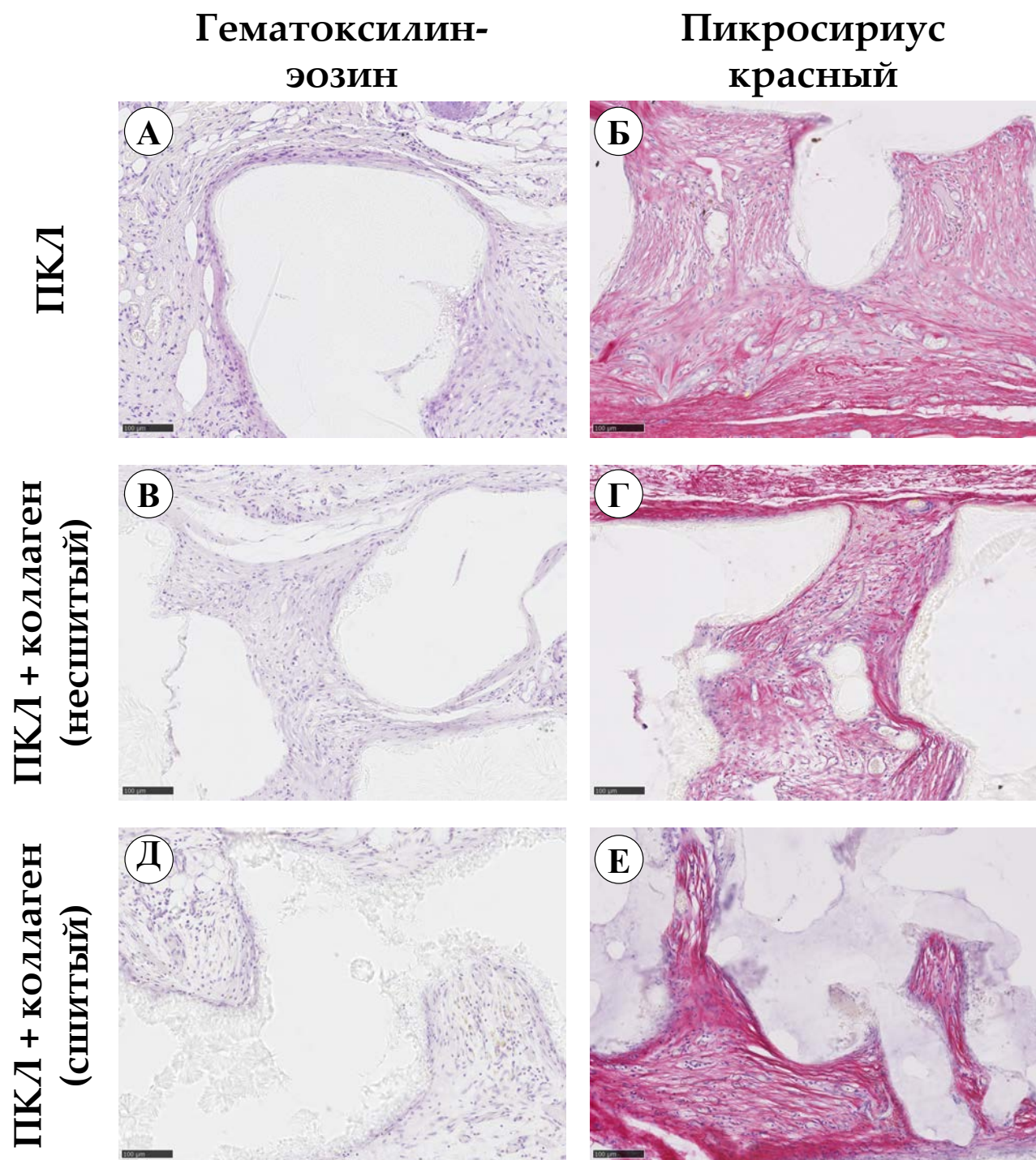


Рисунок 4.4 – Участки имплантаций ПКЛ-скаффолдов без коллагена (А, Б), ПКЛ-скаффолдов с коллагеном (В, Г) и ПКЛ-скаффолдов со сшитым коллагеном (Д, Е), 1 месяц после имплантации. Окраски гематоксилином-эозином и пикросириусом красным, увеличение $\times 200$

Вид скаффолда	Показатели	Этапы наблюдения				p
		Количество клеток на 14-е сутки		Количество клеток на 30-е сутки		
		Абс.	%	Абс.	%	
Скаффолд ПКЛ	единичные клетки	2	100,0	2	100,0	—
	небольшие очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
ПКЛ + коллаген (несшитый)	единичные клетки	2	100,0	0	0,0	0,157
	небольшие очаги клеток	0	0,0	2	100,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
ПКЛ + коллаген (сшитый)	единичные клетки	0	0,0	0	0,0	nan
	небольшие очаги клеток	2	100,0	1	50,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	1	50,0	
p		0,050*		0,092		—

Примечание: * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

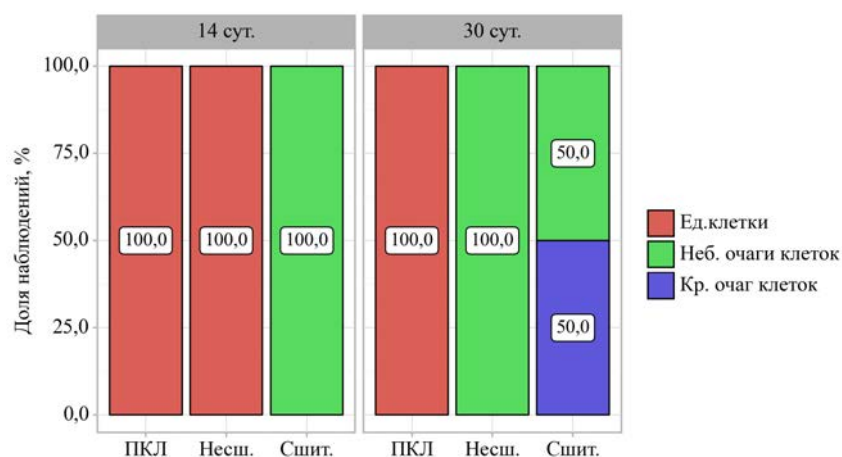


Рисунок 4.5 – Количество нейтрофилов в зависимости от видов скаффолда – ПКЛ, ПКЛ + коллаген, сшитый и несшитый глютаральдегидом

В ходе анализа количества макрофагов на 14-е сутки ($p = 0,135$) и 30-е сутки ($p = 0,343$) статистически значимые различия также не были выявлены (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Анализ данных Таблицы 4.2 и Рисунка 4.6 показал, что в группе скаффолда ПКЛ ($p = 0,317$), скаффолда ПКЛ + коллаген (сшитый) ($p = 0,500$) не удалось установить статистически значимых изменений (используемые методы: тест Макнемара и критерий Уилкоксона).

Таблица 4.2 – Количество макрофагов в зависимости от вида скаффолда

Вид скаффолда	Показатели	Этапы наблюдения				p
		Количество клеток на 14-е сутки		Количество клеток на 30-е сутки		
		Абс.	%	Абс.	%	
Скаффолд ПКЛ	единичные клетки	2	100,0	1	50,0	0,317
	небольшие очаги клеток	0	0,0	1	50,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
ПКЛ + коллаген (несшитый)	единичные клетки	0	0,0	0	0,0	—
	небольшие очаги клеток	2	100,0	2	100,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
ПКЛ + коллаген (сшитый)	единичные клетки	1	50,0	0	0,0	0,500
	небольшие очаги клеток	1	50,0	1	50,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	1	50,0	
p		0,135		0,343		—

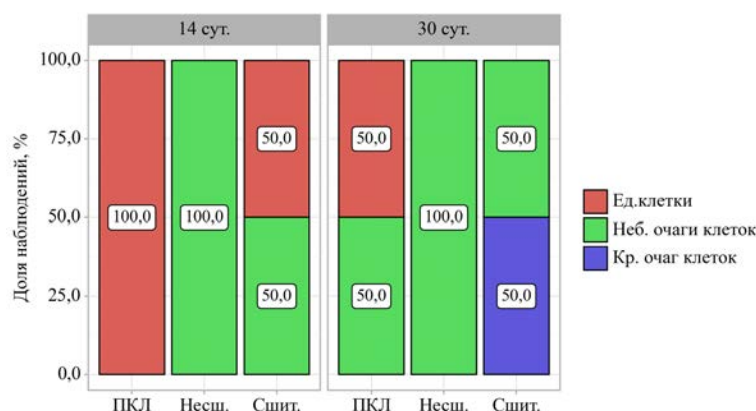


Рисунок 4.6 – Количество макрофагов в зависимости от видов скаффолда – ПКЛ, ПКЛ + коллаген, сшитый и несшитый глютаральдегидом

При сравнении данных из Таблицы 4.3 на количество клеток инородного тела на 14-е сутки ($p = 0,472$) и на 30-е сутки ($p = 0,343$) не удалось установить статистически значимых различий (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). В процессе анализа в группе скаффолда ПКЛ + коллаген (несшитый) ($p = 0,317$) и в группе скаффолда ПКЛ + коллаген (сшитый) ($p = \text{nan}$) не удалось выявить статистически значимых изменений (используемый метод: критерий Уилкоксона и тест Макнемара) (Рисунок 4.7).

Таблица 4.3 – Количество клеток инородных тел в зависимости от виды скаффолда

Вид скаффолда	Показатели	Этапы наблюдения				p
		Количество клеток на 14-е сутки		Количество клеток на 30-е сутки		
		Абс.	%	Абс.	%	
Скаффолд ПКЛ	единичные клетки	0	0,0	0	0,0	—
	небольшие очаги клеток	2	100,0	2	100,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
ПКЛ + коллаген (несшитый)	единичные клетки	1	50,0	0	0,0	0,317
	небольшие очаги клеток	1	50,0	1	50,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	1	50,0	
ПКЛ + коллаген (сшитый)	единичные клетки	1	50,0	1	50,0	nan
	небольшие очаги клеток	1	50,0	1	50,0	
	крупные очаги клеток	0	0,0	0	0,0	
p		0,472		0,343		—

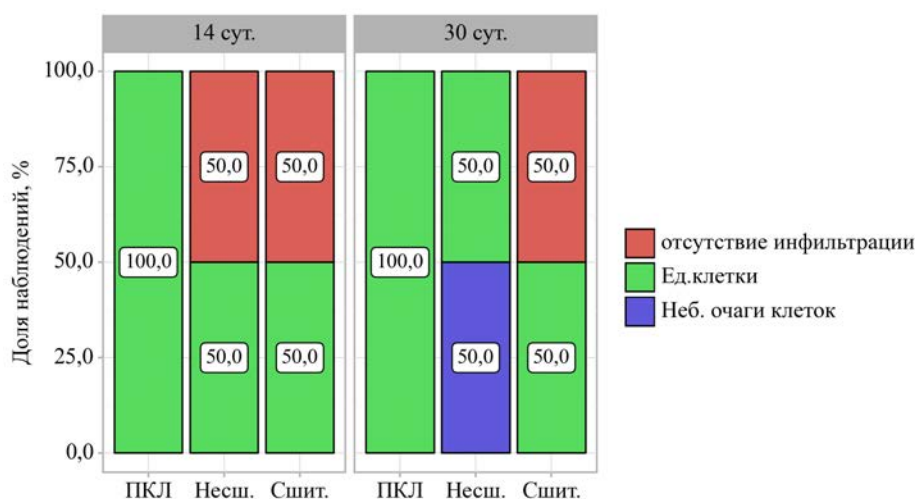


Рисунок 4.7 – Количество клеток инородных тел в зависимости от видов скаффолда – ПКЛ, ПКЛ + коллаген, сшитый и несшитый глутаральдегидом

Таким образом, сшивка коллагеновых гидрогелей глутаровым альдегидом привела к увеличению присутствия коллагеновых гидрогелей в пространствах между фрагментами поликапролактоновой основы скаффолда. Такие участки сшитого коллагена определялись как плотные регионы внеклеточного матрикса с инфильтрацией макрофагами. При этом в сшитых скаффолдах более интенсивно происходил процесс резорбции поликапролактоновой основы. На сам материал скаффолда, ПКЛ, выраженного воспалительного ответа не определялось, что говорит о низкой токсичности. ПКЛ относительно биосовместим и вызывает умеренную воспалительную реакции – преимущественно со стороны макрофагов.

4.2. Результаты после имплантации в коленный сустав

4.2.1. Локальный статус и качество жизни кроликов после имплантации скаффолда

В ходе анализа показателей по шкале гримас кролика на трех этапах – на 1-е сутки ($p = 0,892$), 3-и сутки ($p = 0,440$) и на 10-е сутки ($p = 0,853$) после оперативного вмешательства – нам не удалось установить статистически значимых различий (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Данные

Таблица 4.4 – Средние значения баллов по шкале гримас кроликов в зависимости от вида имплантируемого скаффолда

В зависимости от вида хирургического доступа также была проведена оценка динамики баллов по шкале гримас кроликов (Таблица 4.5, Рисунок 4.8).

Таблица 4.5 – Средние значения баллов по шкале гримас кроликов в зависимости от вида хирургического доступа

Вид хирургического доступа	Баллы по шкале grimas кролика на этапах наблюдения						p
	1-е сутки		3-и сутки		10-е сутки		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Длинный парапателлярный	8,00 (n=12)	7,75 – 8,25	7,00 (n=12)	6,75 – 8,00	6,00 (n=12)	6,00 – 7,00	<0,001* p _{1 сут-10 сут} <0,001
Короткий медиальный	7,00 (n=12)	6,00 – 7,00	6,00 (n=12)	6,00 – 7,00	5,00 (n=12)	5,00 – 5,25	<0,001* p _{1 сут-10 сут} = 0,003 p _{3 сут-10 сут} = 0,007
p	0,892		0,440		0,853		–

Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

Представленные в таблице данные демонстрируют, что при сравнении полученных по шкале гримас кроликов баллов на 1-е сутки ($p < 0,001$), на 3-и сутки ($p = 0,011$) и на 10-е сутки ($p < 0,001$) были выявлены существенные различия (используемый метод: U-критерий Манна–Уитни). На каждой временной точке среднее значение баллов при коротком медиальном доступе на 1 балл меньше, чем при длинном парапателлярном доступе, что говорит о меньшем болевом синдроме при использовании короткого медиального доступа.

В процессе анализа баллов по шкале гримас кроликов внутри группы при длинном парапателлярном доступе и при коротком медиальном доступе были выявлены статистически значимые изменения ($p < 0,001$) (используемый метод: критерий Фридмана).

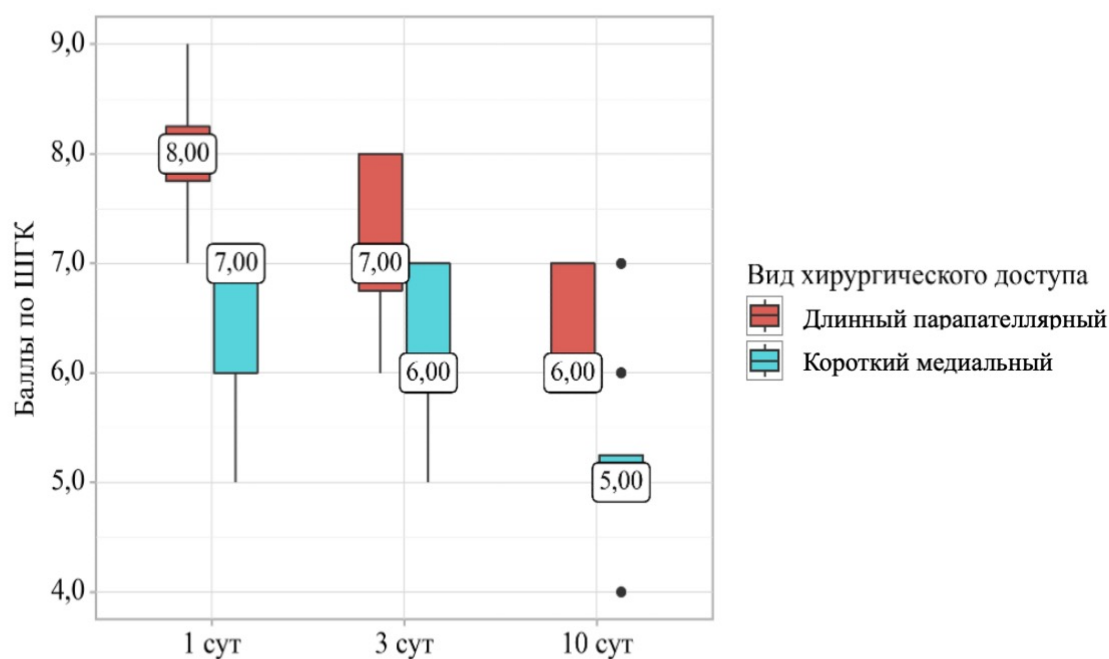


Рисунок 4.8 – Динамика средних значений баллов по шкале гримас кроликов в зависимости от вида хирургического доступа

Через 10 дней после операции у всех животных в области швов наблюдались сформированные рубцы, также было зафиксировано появление отека с напряженной жидкостью в медиальной области коленного сустава. У некоторых особей локальные отечные явления отмечались до 3 недель после оперативного вмешательства (Рисунок 4.9). Однако у большинства кроликов через 10 дней после



Данные анализа динамики охвата коленного сустава в зависимости от вида хирургического доступа отображены в Таблице 4.6 и на Рисунке 4.10.

Таблица 4.6 – Средние значения охвата коленного сустава в зависимости от вида хирургического доступа (в см)

Вид хирургического доступа	Охват коленного сустава на этапах наблюдения (см)						p
	1-е сутки		3-и сутки		10-е сутки		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Длинный парapatеллярный	18,25 (n=24)	17,00 – 20,00	17,00 (n=24)	16,38 – 18,25	16,50 (n=24)	16,00 – 17,62	<0,001* p 1 сут. –3 сут. <0,001 p 1 сут. –10 сут. <0,001 p 3 сут. –10 сут. = 0,050
Короткий медиальный	16,75 (n=24)	16,00 – 17,00	16,00 (n=24)	15,75 – 16,62	16,00 (n=24)	15,00 – 16,12	0,007* p 1 сут. –10 сут. = 0,008
p	<0,001*		<0,001*		0,008*		–

Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

В процессе анализа показатели на всех этапах имели статистически значимые различия при использовании U–критерий Манна–Уитни: охват коленного сустава кролика на 1-е сутки ($p < 0,001$), на 3-и сутки ($p < 0,001$) и на 10-е сутки ($p = 0,008$). При этом охват коленных суставов в первые сутки в среднем был больше на 1,5 см при использовании длинного парапателлярного доступа, чем при использовании короткого медиального доступа.

В процессе анализа при использовании критерия Фридмана в группе при использовании длинного парапателлярного доступа были выявлены статистически значимые изменения ($p < 0,001$), так же как и в группе прооперированных через короткий медиальный доступ были установлены статистически значимые изменения ($p = 0,007$). При использовании длинного парапателлярного доступа увеличивается отек коленного сустава на первые сутки по сравнению с десятыми сутками после операции на 10%.

Применение короткого медиального доступа дает увеличение диаметра из-за отека коленного сустава на 5%, которое приходит в прежнее состояние к 3-м суткам.

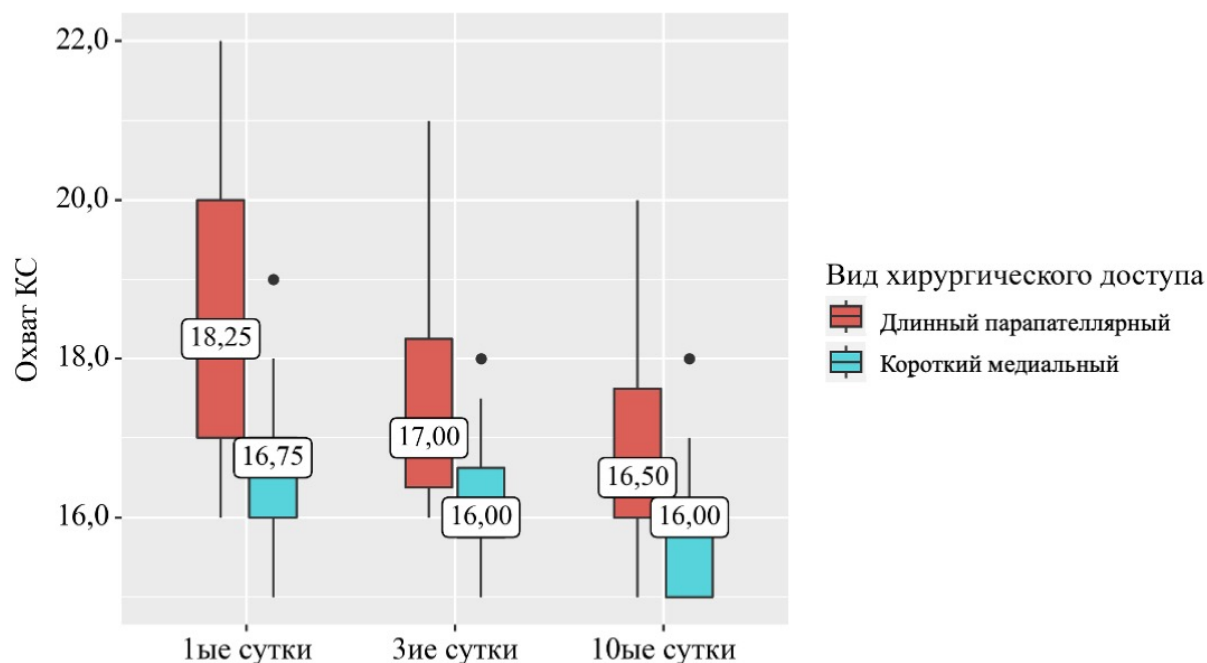


Рисунок 4.10 – Динамика показателей охвата коленного сустава в зависимости от вида хирургического доступа на трех временных промежутках

В процессе анализа показателя веса на всех этапах не удалось установить статистически значимых различий между группами с различными имплантами и менискэктомией ($p_{1 \text{ мес.}} = 0,175$; $p_{3 \text{ мес.}} = 0,245$; $p_{6 \text{ мес.}} = 0,266$) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса).

В отдельно взятых группах скаффолда ПКЛ и комбинированного скаффолда не удалось выявить статистически значимых изменений на протяжении трех этапов исследования ($p = 0,135$) (используемый метод: критерий Фридмана). Однако в группе менискэктомии нами были установлены статистически значимые изменения ($p = 0,039$) (используемый метод: критерий Фридмана). В группе менискэктомии увеличение веса на третьем месяце отмечалось незначительно, однако особи прибавили в весе к последнему сроку на 30,6% (Таблица 4.7, Рисунок 4.11).

Таблица 4.7 – Средние значения веса кролика в зависимости от применяемых имплантов

[illegible]

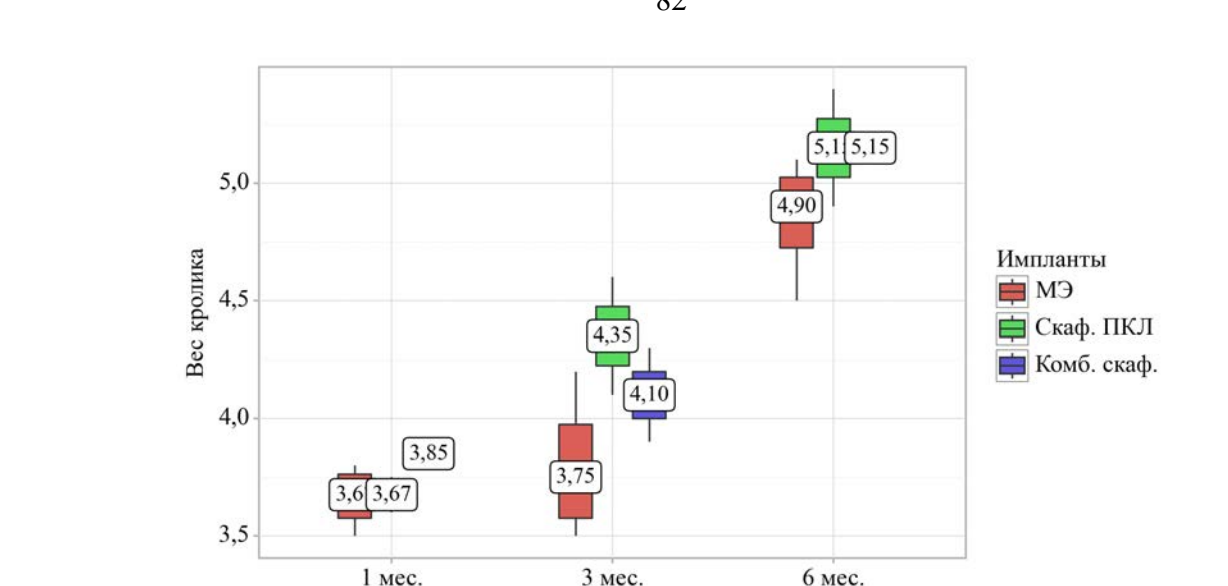


Рисунок 4.11 – Динамика веса кроликов в зависимости от используемых скаффолдов на трех временных точках (в килограммах)

В ходе анализа показателя веса на всех этапах не удалось выявить статистически значимых различий ($p_{1 \text{ мес.}} = 0,323$; $p_{3 \text{ мес.}} = 0,321$, $p_{6 \text{ мес.}} = 0,479$) (используемый метод: t–критерий Стьюдента).

При оценке полученных данных в группе короткого медиального доступа были установлены статистически значимые изменения ($p = 0,001$) (используемый метод: критерий Фишера с повторными измерениями). Проведенный анализ показал, что в группе длинного парапателлярного доступа изменения были статистически значимыми ($p < 0,001$) (используемый метод: критерий Фишера с повторными измерениями) (Таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Средние значения веса кролика в зависимости от хирургического доступа

Хирургический доступ	Вес особей на всех этапах наблюдения (кг)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	M ± SD	95% ДИ	M ± SD	95% ДИ	M ± SD	95% ДИ	
Короткий медиальный	3,76 ± 0,12	3,56 – 3,96	4,15 ± 0,47	3,41 – 4,89	5,08 ± 0,25	4,68 – 5,47	0,001* p _{1 мес. – 6 мес.} = 0,014 p _{3 мес. – 6 мес.} = 0,014
Длинный парапателлярный	3,66 ± 0,14	3,44 – 3,88	3,88 ± 0,21	3,55 – 4,20	4,92 ± 0,31	4,43 – 5,42	< 0,001* p _{1 мес – 3 мес} = 0,048 p _{1 мес – 6 мес} = 0,005 p _{3 мес – 6 мес} = 0,006
p	0,323		0,321		0,479		—

Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

На втором этапе оценивали подвижность по шкале ВВВ и угол наклона положения стопы относительно тела при ходьбе кроликов.

Был выполнен анализ динамики шкалы ВВВ в зависимости от вида импланта (Таблица 4.9, Рисунок 4.12).

Таблица 4.9 – Средние показатели значений по шкале ВВВ в зависимости от вида импланта на трех временных точках

Вид импланта	Баллы по шкале ВВВ после имплантации на трех этапах наблюдения						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Менискэктомия	14,00 (n=4)	13,75 – 14,00	15,00 (n=4)	14,75 – 15,25	15,50 (n=4)	15,00 – 16,25	0,022*
Скаффолд ПКЛ	14,00 (n=2)	14,00 – 14,00	16,00 (n=2)	15,50 – 16,50	17,50 (n=2)	16,75 – 18,25	0,135
Комбинированный скаффолд	15,50 (n=2)	15,25 – 15,75	16,50 (n=2)	16,25 – 16,75	16,50 (n=2)	15,75 – 17,25	0,368
p	0,067		0,224		0,443		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p <0.05)							

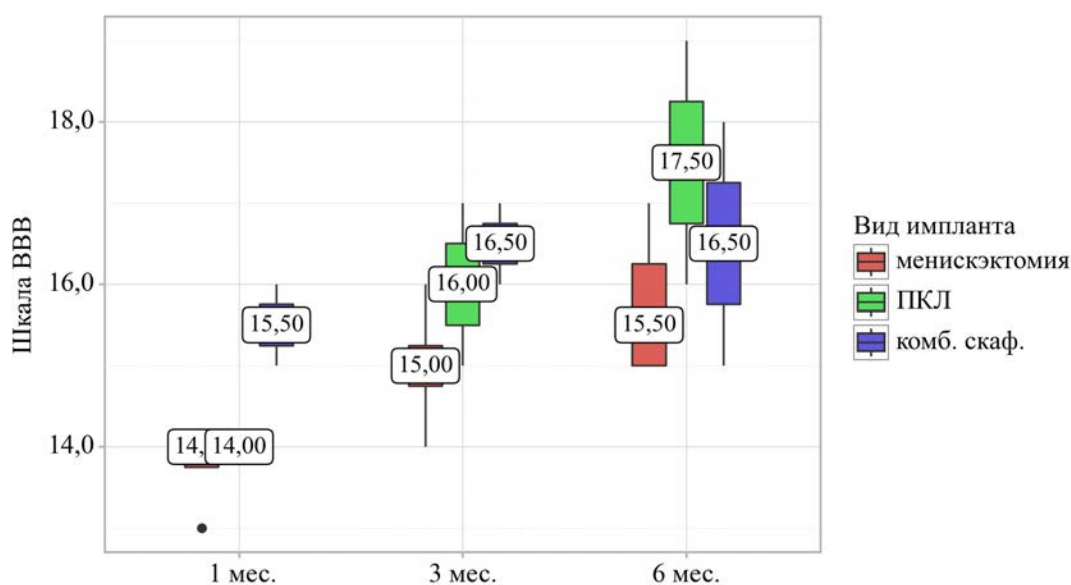


Рисунок 4.12 – Средние показатели значений по шкале ВВВ в зависимости от вида импланта на трех временных точках

В соответствии с представленной Таблицей 4.9 при сравнении баллов по шкале ВВВ на 1-м месяце (p = 0,067), на 3-м месяце (p = 0,224) и на 6-м месяце

($p = 0,443$) после имплантации не удалось выявить значимых различий (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса).

В процессе анализа в группе менискэктомии нами были выявлены статистически значимые изменения ($p = 0,022$) (используемый метод: критерий Фридмана). В ходе анализа в группе ПКЛ-скаффолда и комбинированного скаффолда нам не удалось установить статистически значимых изменений ($p = 0,135$) (используемый метод: критерий Фридмана). Анализ показал, что в группе комбинированного скаффолда не удалось выявить статистически значимых изменений ($p = 0,368$) (используемый метод: критерий Фридмана).

Проведен анализ динамики шкалы ВВВ в зависимости от вида хирургического доступа (Таблица 4.10, Рисунок 4.13).

Таблица 4.10 – Средние показатели значений по шкале ВВВ в зависимости от хирургического доступа на трех временных точках

Вид хирургического доступа	Баллы по шкале ВВВ на всех этапах наблюдения после имплантации скаффолдов						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Длинный парapatеллярный	14,00 (n=4)	14,00 – 14,25	15,50 (n=4)	15,00 – 16,00	15,00 (n=4)	15,00 – 16,25	0,071
Короткий медиальный	14,00 (n=4)	13,75 – 14,50	16,00 (n=4)	14,75 – 17,00	17,00 (n=4)	15,75 – 18,25	0,018*
p	0,741		0,765		0,297		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							

В ходе сравнения баллов по шкале ВВВ через 1 месяц ($p = 0,741$), 3 месяца ($p = 0,765$) и 6 месяца ($p = 0,297$) после имплантации статистически значимых отличий не было определено (используемый метод: U–критерий Манна–Уитни).

Проведенный анализ показал, что в группе с длинным парapatеллярным доступом изменения не являются статистически значимыми ($p = 0,071$) (используемый метод: критерий Фридмана). При этом в группе короткого медиального доступа отмечались статистически значимые изменения ($p = 0,018$) (используемый метод: критерий Фридмана).

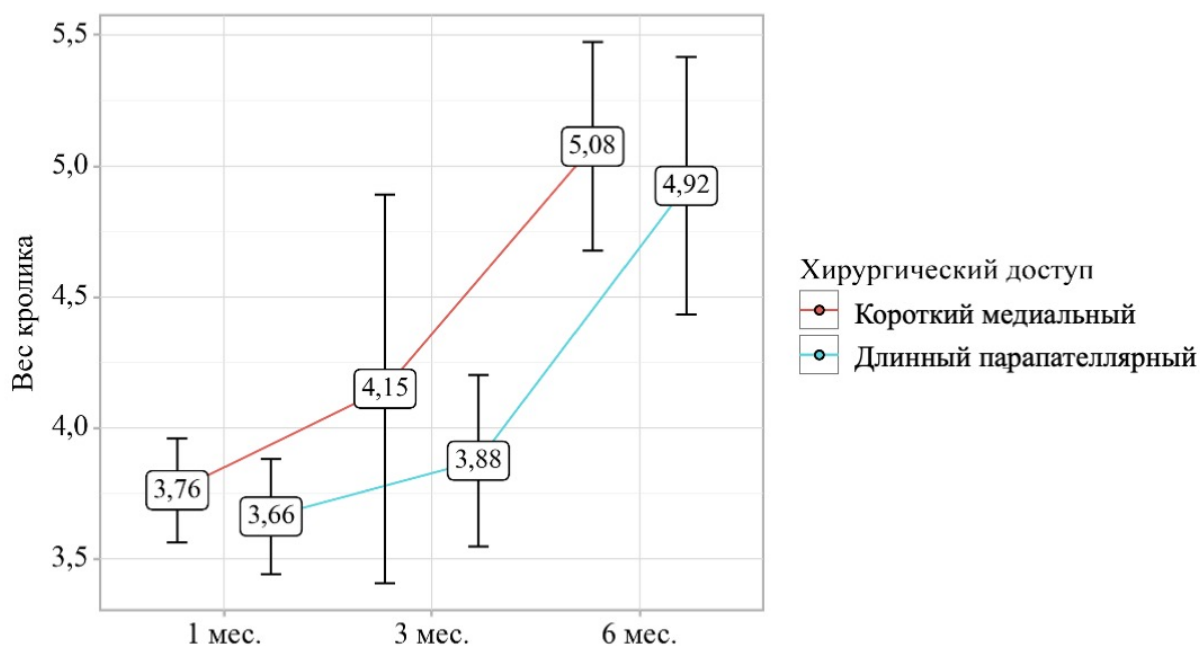


Рисунок 4.13 – Средние показатели значений по шкале ВВВ в зависимости от хирургического доступа на трех временных точках

При анализе угла постановки стопы относительно тела животного через 1 месяц ($p = 0,023$) и 6 месяцев ($p = 0,003$) после имплантации были выявлены статистически значимые различия (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Так, например, среднее значение угла стопы относительно тела кролика у имплантированного комбинированного скаффолда превосходило значение у особей с менискэктомией на 2,5 градуса, но было меньше на 2 градуса по сравнению с имплантированными скаффолдами ПКЛ.

В процессе сравнения показателя угла постановки стопы относительно тела через 3 месяца после имплантации нам не удалось выявить статистически значимых различий ($p = 0,085$) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса).

Проведенный анализ показал, что показатели угла относительно стопы также отличались в каждой группе на каждом временном промежутке: группа менискэктомии ($p < 0,001$), скаффолд ПКЛ ($p = 0,022$) и комбинированный скаффолд ($p = 0,018$) были выявлены статистически значимые изменения (используемый метод: критерий Фридмана) (Таблица 4.11, Рисунок 4.14).

Таблица 4.11 – Средние значения показателя угла постановки стопы в зависимости от вида импланта

Вид импланта	Угол постановки стопы относительно тела на трех этапах наблюдения после имплантации (в градусах)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Менискэктомия	16,50 (n=8)	15,00 – 17,25	20,00 (n=8)	19,75 – 23,00	25,00 (n=8)	23,75 – 25,50	<0,001* p _{1 мес.– 6 мес.} = 0,004
Скаффолд ПКЛ	21,00 (n=4)	19,75 – 22,50	27,50 (n=4)	23,75 – 30,00	42,50 (n=4)	38,75 – 46,25	0,022*
Комбинированный скаффолд	19,00 (n=4)	17,25 – 20,50	22,50 (n=4)	20,00 – 25,00	40,00 (n=4)	33,75 – 45,00	0,018*
p	0,023* p _{скафф. ПКЛ – МЭ} = 0,020		0,085		0,003* p _{скафф. ПКЛ – МЭ} = 0,009 p _{комб.скафф. – МЭ} = 0,022		—
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							

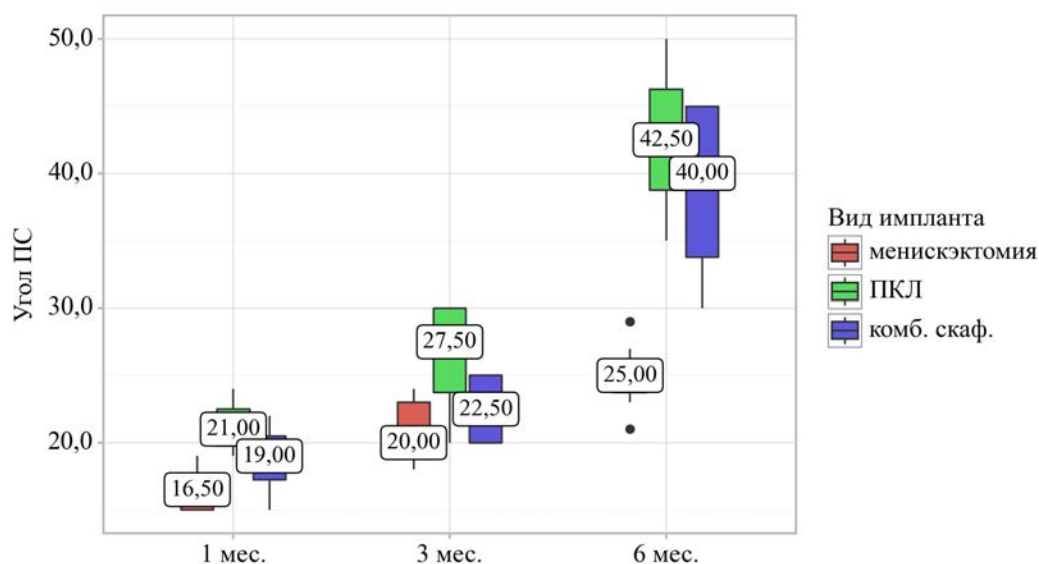


Рисунок 4.14 – Средние значения угла постановки стопы в зависимости от вида имплантированного скаффолда (в градусах)

Таким образом, наличие скаффолда показывало больший результат относительно менискэктомии – от 25% до 70% на каждой временной точке измерения. При сравнении первоначального угла стопы относительно тела возможно отметить улучшения у особей после 6 месяцев имплантации на 51,5% в группе менискэктомии, на 102% в группе ПКЛ-скаффолдов и на 110% в группе с комбинированными скаффолдами при сравнении с особями после 1-го месяца имплантации.

Проведен анализ динамики угла стопы относительно тела кролика в зависимости от вида хирургического доступа.

При сравнении данных через 1 и 3 месяца ($p = 0,710$ и $p = 0,957$ соответственно) после имплантации статистически значимые различия не были установлены (используемый метод: U-критерий Манна–Уитни). Проведенный анализ показал, что в группе особей, которые были прооперированы через длинный парапателлярный доступ, установлены статистически значимые изменения ($p < 0,001$), как и в группе с применением короткого медиального доступа ($p < 0,001$) (используемый метод: критерий Фридмана) (Таблица 4.12, Рисунок 4.15).

Таблица 4.12 – Средние значения угла постановки стопы в зависимости от вида хирургического доступа

Вид хирургического доступа	Угол постановки стопы относительно тела на трех этапах наблюдения после имплантации (в градусах)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Длинный парапателлярный	18,00 (n=8)	16,50 – 20,50	21,50 (n=8)	19,75 – 26,25	30,00 (n=8)	24,50 – 45,00	<0,001* p _{1 мес.– 6 мес.} = 0,004
Короткий медиальный	18,00 (n=8)	15,75 – 19,25	21,50 (n=8)	20,00 – 24,25	29,50 (n=8)	26,50 – 36,25	<0,001* p _{1 мес.– 6 мес.} = 0,004
p	0,710		0,957		0,958		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p <0.05)							

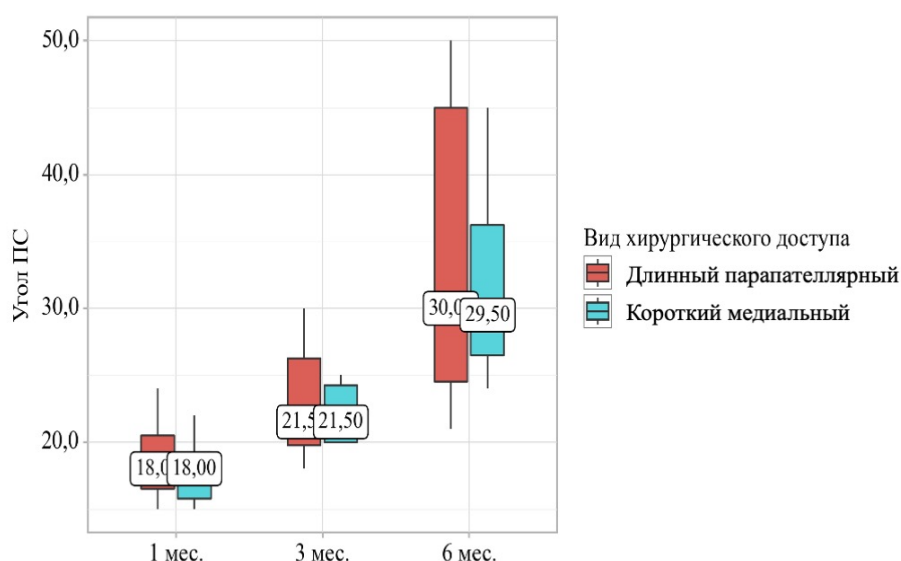


Рисунок 4.15 – Средние значения угла постановки стопы в зависимости от вида хирургического доступа (в градусах)

4.2.2. Исследование эксплантов после выведения животных из эксперимента

Визуальные изменения. Через 1 месяц после имплантации скаффолды были слегка деформированными. В 30% случаев наблюдалось незначительное разрушение имплантов в области прикрепления к переднему рогу медиального мениска. Фиброзная ткань покрывала до 90% объема скаффолдов менисков во всех случаях.

Через 3 и 6 месяцев после имплантации в группе животных, получивших ПКЛ-гидрогель, имплантаты имели форму и размеры нативного мениска и глянцево-белый цвет, в отличие от имплантов в группе, получившей скаффолды ПКЛ ($p < 0,05$). В целом, морфология регенерированного мениска через 6 месяцев была заметно лучше, чем через 3 месяца, во всех группах, где были имплантированы каркасы.

При визуальном осмотре у 33% особей в подгруппе с хирургическим доступом по медиальной поверхности квадрицепса через 6 месяцев скаффолды дислоцировались и находились перпендикулярно по отношению к суставной поверхности большеберцовой кости и прилежали к капсуле сустава.

При сопоставлении дислоцированного скаффолда в зависимости от вида хирургического доступа статистически значимые различия не выявлены ($p = 0,093$) (используемый метод: точный критерий Фишера) (Таблица 4.13, Рисунок 4.16).

Таблица 4.13 – Дислокации скаффолдов в зависимости от вида хирургического доступа (кол-во наблюдений)

	Хирургический доступ		p
	Длинный парapatеллярный	Короткий медиальный	
Скаффолд дислоцирован	4 (33,3 %)	0	0,093
Нет дислокации	8 (66,7 %)	12 (100,0 %)	
Всего	12 (100 %)	12 (100,0 %)	

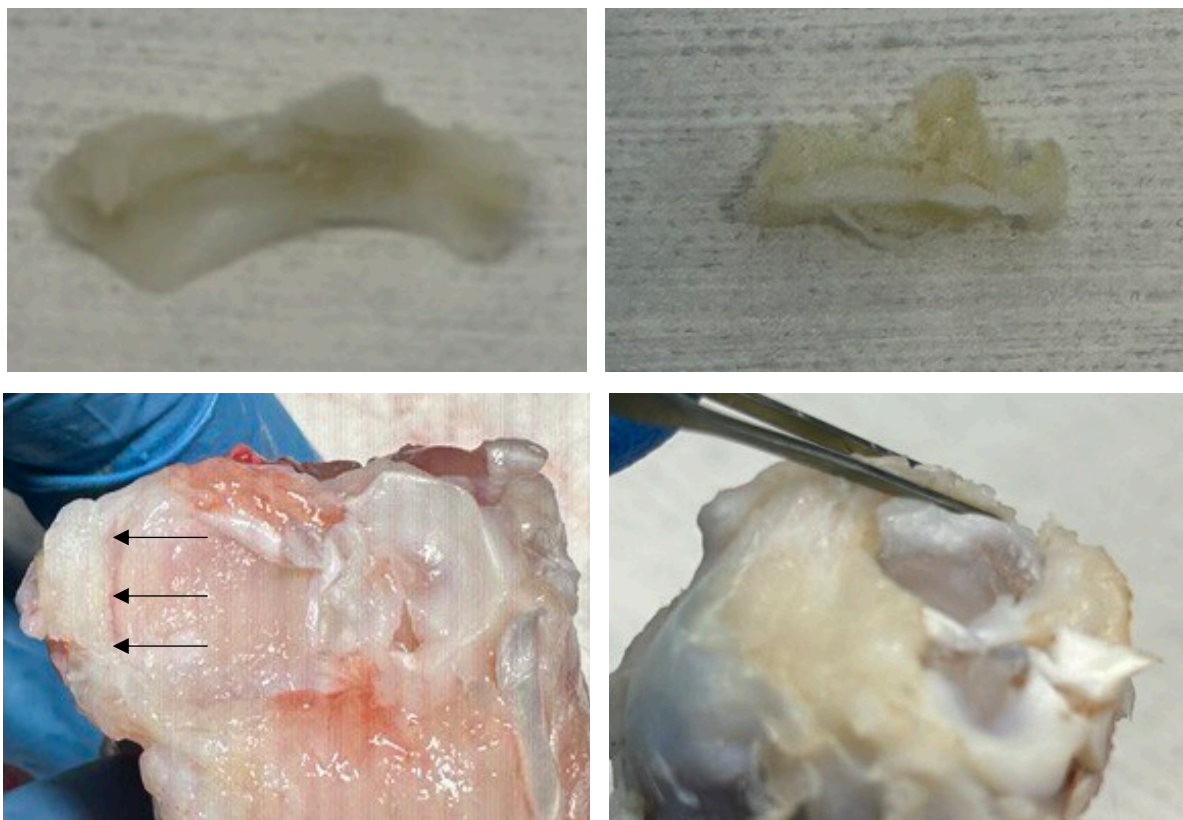


Рисунок 4.16 – Образцы дислоцированных скаффолдов менисков в подгруппе с дислоцированным надколенником

Механические изменения. Был проведен анализ результатов механического теста на инденции скаффолдов в зависимости от вида импланта. По результатам механического теста на инденции скаффолдов после 1-го и 3-го месяцев имплантации статистически значимые различия не выявлены ($p_1 \text{ мес.} = 0,553$; $p_3 \text{ мес.} = 0,136$) (используемый метод: t-критерий Стьюдента). В процессе сравнения показателя на этапе механического теста на инденции скаффолда ПКЛ и комбинированного скаффолда после 6 месяцев имплантации были установлены существенные различия ($p = 0,018$) (используемый метод: t-критерий Стьюдента). Прочность комбинированного скаффолда больше на 2,91 МПа в отличие от ПКЛ-скаффолда.

В ходе анализа в группе комбинированного скаффолда не удалось установить статистически значимых изменений ($p = 0,067$) (используемый метод: критерий Фишера с повторными измерениями). Анализ показал, что в группе скаффолд ПКЛ были установлены статистически значимые изменения ($p = 0,013$) (используемый метод: критерий Фишера с повторными измерениями), которые показывают

потерю прочности скаффолда на 5,04 МПа относительно результатов этого же скаффолда на 3-ем месяце имплантации (Таблица 4.14, Рисунок 4.17).

Таблица 4.14 – Средние значений при инденции скаффолдов в зависимости от вида импланта на трех этапах наблюдения

Вид импланта	Значения инденции скаффолдов на трех этапах наблюдения (в МПа)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	М ± SD	95% ДИ	М ± SD	95% ДИ	М ± SD	95% ДИ	
Скаффолд ПКЛ	31,26 ± 2,63 (n=4)	27,07 – 35,45	31,45 ± 3,17 (n=4)	26,41 – 36,49	26,48 ± 0,84 (n=4)	25,15 – 27,81	0,013*
Комбинированный скаффолд	32,52 ± 3,01 (n=4)	27,73 – 37,31	28,60 ± 0,96 (n=4)	27,08 – 30,13	29,39 ± 1,60 (n=4)	26,85 – 31,94	0,067
p	0,553		0,136		0,018*		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							

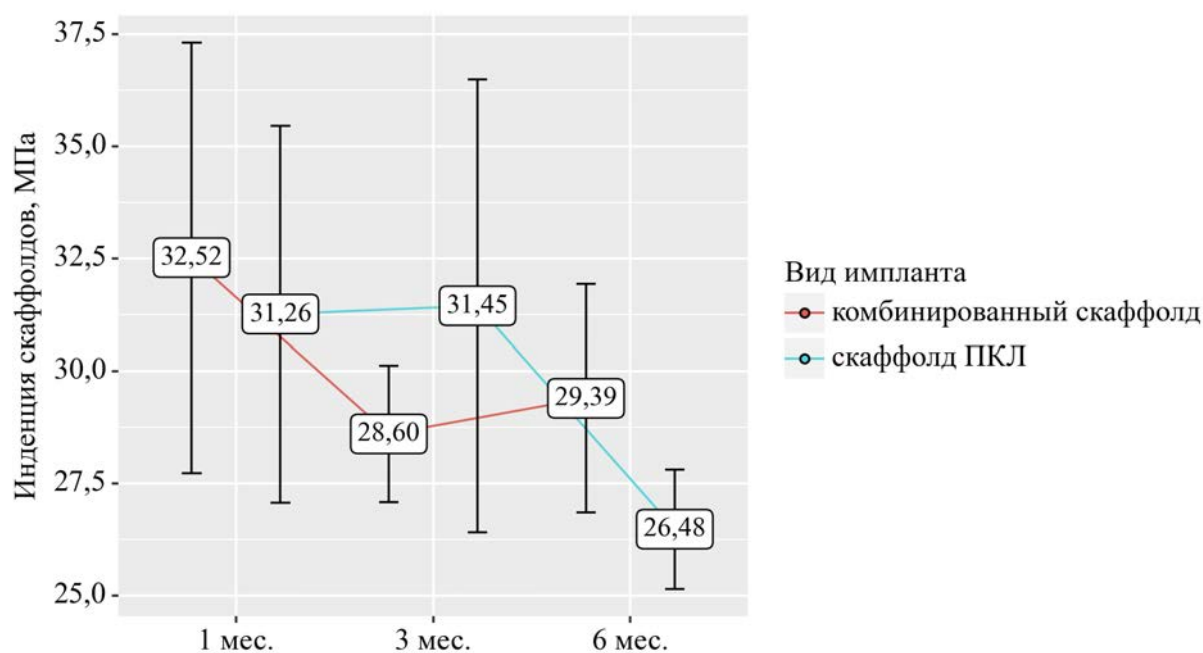


Рисунок 4.17 – Результаты механического тестирования скаффолдов на инденцию скаффолдов в зависимости от вида импланта

Также был выполнен анализ механического теста на растяжение скаффолдов в зависимости от вида импланта, результаты которого отображены в Таблице 4.15 и на Рисунке 4.18.

При анализе результатов растяжения двух видов скаффолда были установлены существенные различия на каждом из этапов исследования: $p_1 \text{ мес.} = 0,028$; $p_3 \text{ мес.} < 0,001$; $p_6 \text{ мес.} = 0,004$ (используемый метод: t-критерий Стьюдента). В ходе анализа скаффолдов внутри каждой группы на всех этапах не удалось выявить статистически значимых изменений ($p_{\text{комб. скаф.}} = 0,088$; $p_{\text{скаф. ПКЛ}} = 0,188$) (используемый метод: критерий Фишера с повторными измерениями).

Таблица 4.15 – Данные растяжения двух видов скаффолдов на трех точках постимплантационного периода

Вид импланта	Механический тест на растяжение скаффолда на трех этапах наблюдения (в МПа)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	М ± SD	95% ДИ	М ± SD	95% ДИ	М ± SD	95% ДИ	
Скаффолд ПКЛ	12,14 ± 1,59 (n=4)	9,61 – 14,67	10,05 ± 0,88 (n=4)	8,65 – 11,45	11,70 ± 1,35 (n=4)	9,55 – 13,85	0,188
Комбинированный скаффолд	15,62 ± 1,81 (n=4)	12,74 – 18,50	13,31 ± 0,53 (n=4)	12,46 – 14,15	16,10 ± 1,36 (n=4)	13,94 – 18,25	0,088
p	0,028*		<0,001*		0,004*		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							

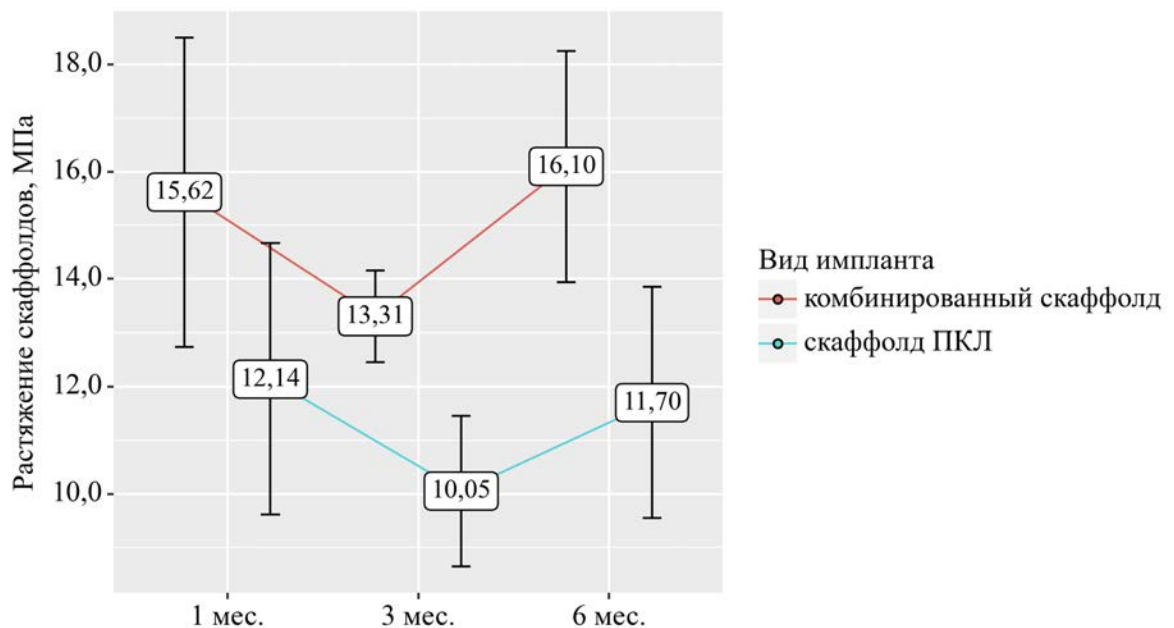


Рисунок 4.18 – Количественные показатели растяжения скаффолдов на трех постимплантационных временных промежутках в зависимости от вида скаффолда

Данные МРТ-исследования. Результаты оценки МРТ-исследования коленных суставов кроликов с помощью шкалы WORMS представлены в виде средних значений в Таблице 4.16 .

Таблица 4.16 – Количественная балльная оценка коленных суставов по МРТ на шкале WORMS в зависимости от вида импланта

Вид импланта	Результаты по шкале WORMS на трех этапах наблюдения (в баллах)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	M ± SD	95% ДИ	M ± SD	95% ДИ	M ± SD	95% ДИ	
Менискэктомия	67,38 ± 7,71	60,93 – 73,82	88,38 ± 5,66	83,65 – 93,10	101,62 ± 10,23	93,08 – 110,17	< 0,001* p 1 мес. –3 мес < 0,001 p 1 мес. –6 мес. < 0,001 p 3 мес –6 мес. = 0,015
Скаффолд ПКЛ	38,75 ± 8,96	24,50 – 53,00	40,25 ± 12,04	21,09 – 59,41	44,75 ± 3,69	38,89 – 50,61	0,384
Комбинированный скаффолд	35,75 ± 4,03	29,34 – 42,16	42,00 ± 10,10	25,93 – 58,07	44,50 ± 8,43	31,09 – 57,91	0,278
p	< 0,001* pкомб. скаф. – МЭ < 0,001 pМЭ – ПКЛ < 0,001		< 0,001* pкомб.скаффолд – МЭ < 0,001 pМЭ – скаф. ПКЛ < 0,001		< 0,001* pкомб.скаффолд – МЭ < 0,001 pМЭ – скаф. ПКЛ < 0,001		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p <0,05)							

В контрольной группе с менискэктомией обнаружены признаки остеоартрита, а именно наличие остеофитов на плато большеберцовой и бедренных костей в медиальном отделе коленного сустава, а также визуализируются обширные дефекты гиалинового хряща. В данной группе эксплантатов наблюдалось наибольшие баллы по шкале WORMS – среднее значение около 73 (p < 0,001).

В группе с имплантированными комбинированными скаффолдами ПКЛ-гидрогель наблюдалась регенерация мениска через 3 месяца после имплантации. Поверхность хряща была гладкой, без признаков воспаления.

Образование новой менисковой ткани также можно было обнаружить в группе ПКЛ, но объем ткани был меньше, чем в группе ПКЛ-гидрогель на всех

временных промежутках. Поверхность хряща в группе, получавшей ПКЛ, была не такой гладкой, как в группе, получавшей ПКЛ-гидрогель. В группе, получавшей ПКЛ, был обнаружен незначительный профиль мениска, но он не был интактным, и сигналы были неясными. Также можно было наблюдать повреждение поверхностного хряща. Однако в контрольной группе с резецированным медиальным мениском не было обнаружено ткани мениска, а суставной хрящ был серьезно поврежден. Оценка по WORMS в группе ПКЛ-гидрогель была значительно ниже (лучше), чем в группах ПКЛ (Рисунки 4.19 и 4.20).

Согласно полученным данным результатов по шкале WORMS в зависимости от вида импланта на 1 месяце ($p < 0,001$), 3 месяце ($p < 0,001$) и 6 месяце ($p < 0,001$) после имплантации были выявлены существенные различия (используемый метод: F-критерий Фишера).

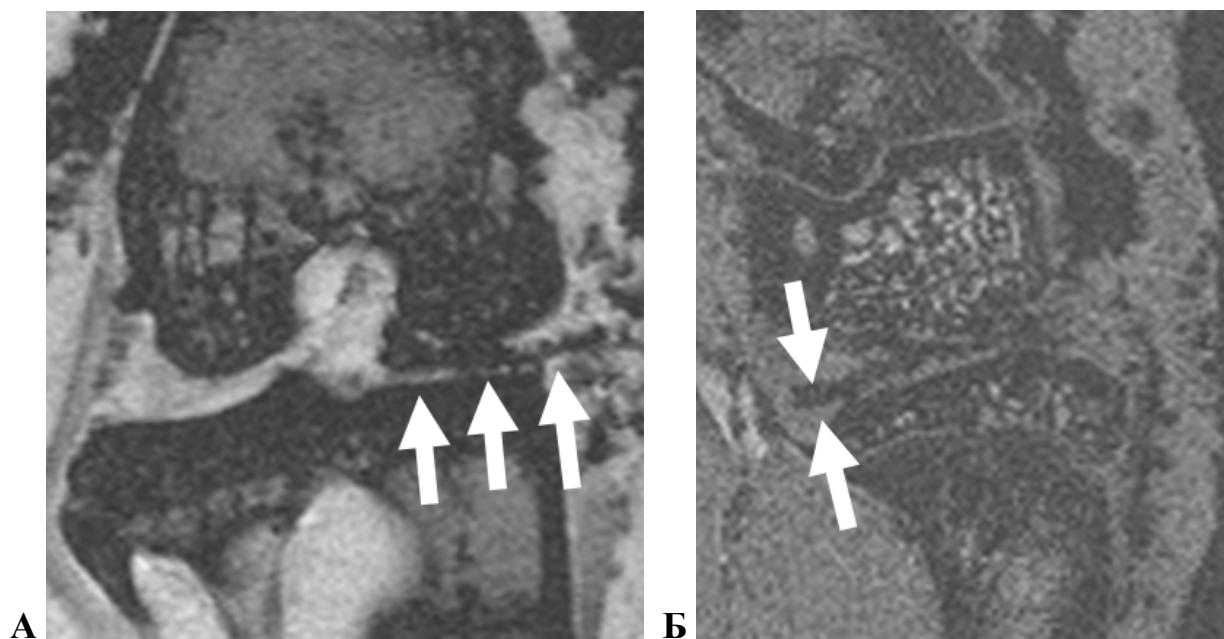


Рисунок 4.19 – МРТ-снимки эксплантированного коленного сустава кролика с имплантированным скаффолдом (обозначен стрелками) в режиме T2 во фронтальном (А) и сагиттальном (Б) срезах в первой точке выведения

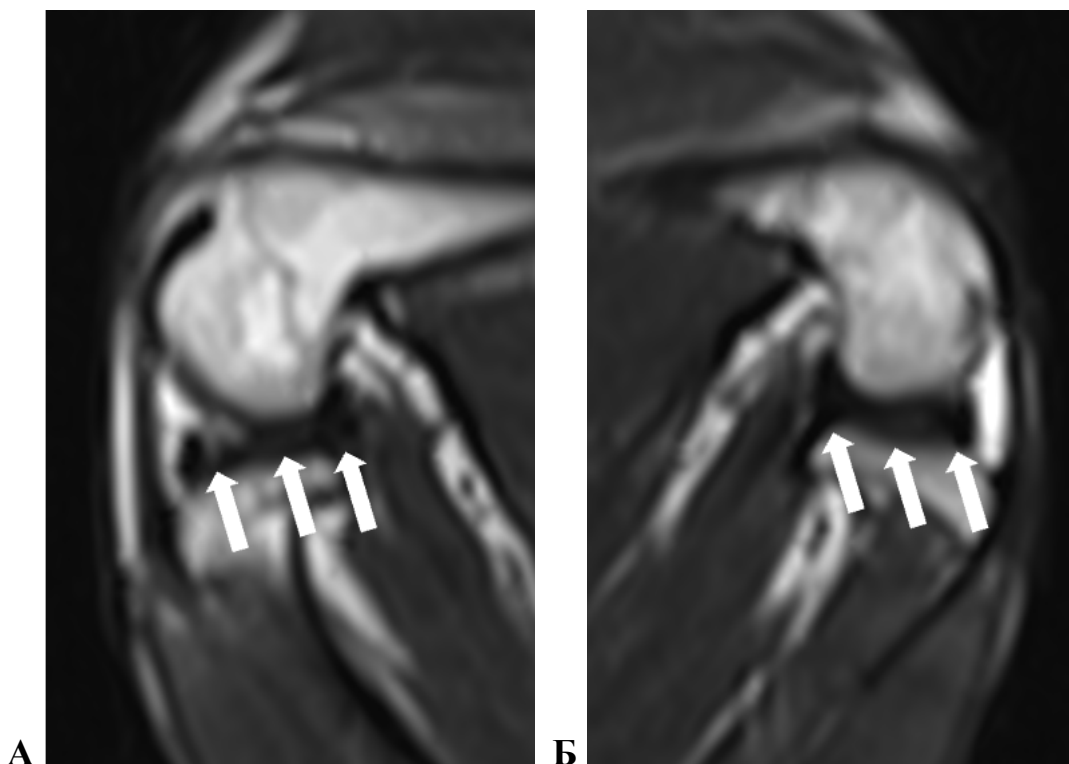


Рисунок 4.20 – Саггитальные срезы коленных суставов после имплантации ПКЛ-скаффолда мениска (А) и комбинированного скаффолда мениска (Б) на 3 месяце после имплантации

При сравнении результатов по шкале WORMS в зависимости от вида хирургического доступа в сроки 1 месяц ($p = 0,834$), 3 месяца ($p = 0,712$) и 6 месяцев ($p = 0,226$) нам не удалось установить статистически значимых различий (используемый метод: U-критерий Манна–Уитни) (Таблица 4.17).

Таблица 4.17 – Количественная балльная оценка коленных суставов по шкале WORMS в зависимости от вида хирургического доступа по данным МРТ

Вид хирургического доступа	Результаты по шкале WORMS на трех этапах наблюдения (в баллах)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Длинный парапателлярный	52,50 (n=8)	39,75 – 61,25	67,00 (n=8)	52,50 – 84,00	78,00 (n=8)	49,75 – 104,50	0,008* P 1 мес. – 6 мес. = 0,029
Короткий медиальный	52,00 (n=8)	37,25 – 69,00	59,50 (n=8)	33,50 – 91,50	65,00 (n=8)	40,00 – 92,00	0,030*
p	0,834		0,712		0,226		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							

Данные гистологического исследования. Гистологическое исследование имплантатов не выявило признаков значительной инфильтрации имплантатов макрофагами. Реакция на инородные тела (макрофаги, гигантские клетки инородного тела) в 15% случаев проявлялась вокруг полимерных каркасов на первой точке выведения. Сохранение остатков каркаса вместе с последующей реакцией на инородное тело наблюдалось как в группах ПКЛ имплантатов, так и в группах комбинированных имплантатов. Более того, реакция на инородное тело локализовалась в некоторых областях имплантатов, где была заметна гипоцеллюлярность. В частности, в группе с комбинированным скаффолдом наблюдалась общая тенденция к снижению количества лимфоцитов и гигантских клеток инородных тел с 3-го по 6-й месяц по мере рассасывания каркаса и регенерации новой хрящевой ткани.

В каждый момент времени все имплантаты демонстрировали обширную васкуляризацию во внешних областях новой ткани мениска. Далее представлены описания состояния скаффолдов на каждом временном отрезке после выведения.

Через 1 месяц

ПКЛ-скаффолд: имплантат прозрачного цвета и тонковолокнистой структуры окружен регенерирующей волокнистой соединительной тканью, состоящей из плотно расположенных пучков коллагеновых волокон, многочисленных фибробластов и единичных кровеносных капилляров (Рисунок 4.21 А, В, Д). При этом во внутреннем слое соединительной ткани, непосредственно прилегающей к имплантату, выявляется узкая полоса веретенообразных фибробластоподобных клеток, слабо окрашенных сафранином О (Рисунок 4.21 Б, Г, Е). Такое окрашивание свидетельствует о низком содержании в этом участке гликозаминогликанов. Овальные хондроцитоподобные клетки в регенерирующей ткани отсутствуют. Интеграции регенерирующей ткани в окружающие ткани мениска не наблюдается. Иногда встречаются крупные очаги хондрогенеза, ярко окрашенные сафранином в красный цвет (Рисунок 4.21 Б), но они сформированы в зонах резорбции макрофагами остатков шовного материала и к регенерации ткани мениска отношение не имеют.

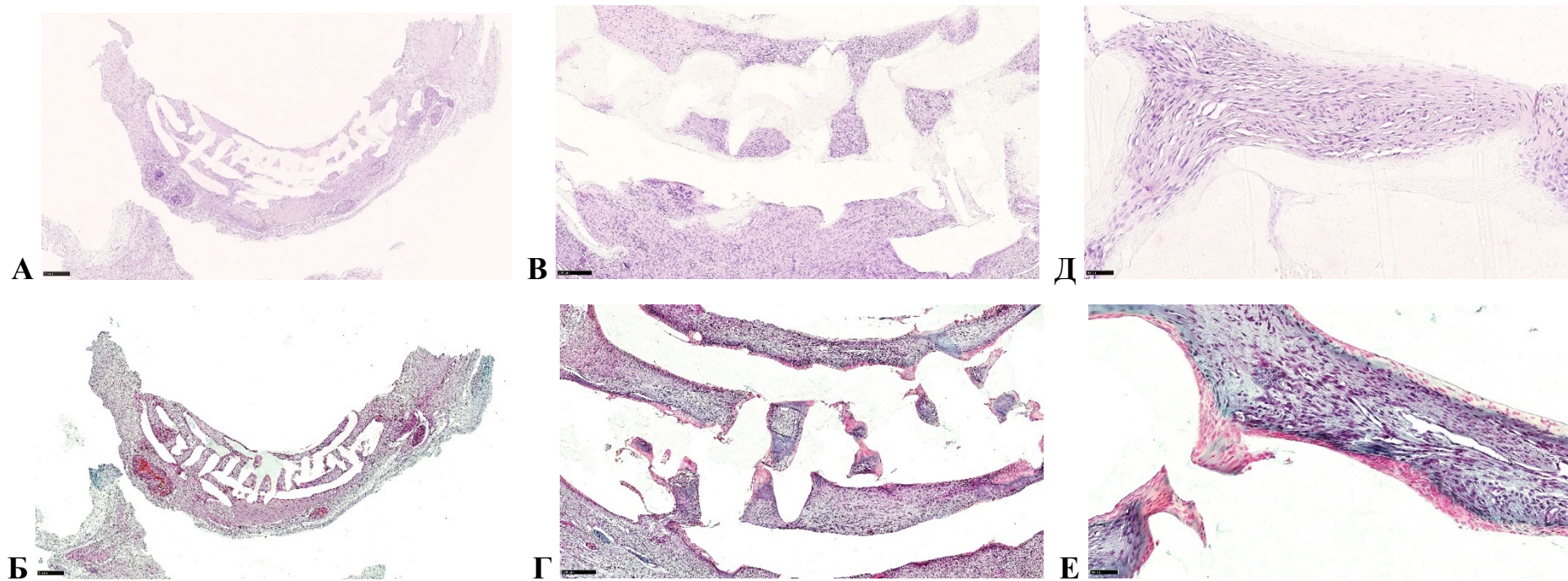


Рисунок 4.21 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ через 1 месяц.

А: общий вид мениска с имплантатом. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 20х.

Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В розовый и красный цвет окрашиваются области, содержащие гликозаминогликаны. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 20х. В: имплантат в окружении регенерирующей соединительной ткани при большем увеличении. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 100х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Регенерирующие фибробластоподобные клетки на границе с имплантатом окрашены в слабо розовый цвет. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 100х. Д: регенерирующая соединительная ткань на границе с имплантатом формирует узкий слой фибробластоподобных клеток. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Е: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый.

Регенерирующие фибробластоподобные клетки на границе с имплантатом окрашены в слабо розовый цвет.

Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х

ПКЛ-основа + сшитые гидрогели из коллагена: так же как и в предыдущей группе, имплантат прорастал регенерирующей соединительной тканью (Рисунок 4.22 А, В, Д), внутренний узкий слой которой на границе с имплантатом был представлен фибробластоподобными клетками, слабо окрашенными сафранином О (Рисунок 4.22 Б, Г). Однако в регенерирующей соединительной ткани, окружающей фрагменты имплантата, начинали выявляться отдельные небольшие скопления округлых хондроцитоподобных клеток, окрашенных сафранином О в слабо розовый цвет (Рисунок 4.22 Б, Е), что свидетельствовало о пока еще низком содержании гликозаминогликанов. Интеграции регенерирующей ткани в окружающие ткани мениска по-прежнему не наблюдалось. Иногда встречались крупные очаги хондрогенеза, ярко окрашенные сафранином в красный цвет (Рисунок 4.22 Б), но они формировались в зонах резорбции макрофагами остатков шовного материала и к регенерации ткани мениска отношение не имели.

Через 3 месяца

ПКЛ-скаффолд: регенерирующая ткань вокруг имплантата на этом временном сроке представлена хрящевой тканью, состоящей из клеток двух типов: хондроцитоподобные и фибробластоподобные клетки (Рисунок 4.23 А–Г). Хондроцитоподобные клетки формировали отдельные небольшие скопления в регенерирующей ткани вокруг фрагментов имплантата (Рисунок 4.24 А). Эти скопления окрашены в интенсивно красный цвет, что свидетельствует о высоком содержании в этих участках гликозаминогликанов (Рисунок 4.24 Б), и располагаются преимущественно во внутреннем слое мениска (Рисунок 4.23 А, Б). Фибробластоподобные клетки располагаются диффузно в регенерирующей хрящевой ткани (Рисунок 4.24 В), окрашиваются в слабо розовый цвет из-за низкого содержания гликозаминогликанов (Рисунок 4.24 Г) и занимают в основном внешний слой мениска (Рисунок 4.23 А, Б). Отмечается частичная связь регенерирующей хрящевой ткани с окружающими тканями мениска (Рисунок 4.23 А, Б).

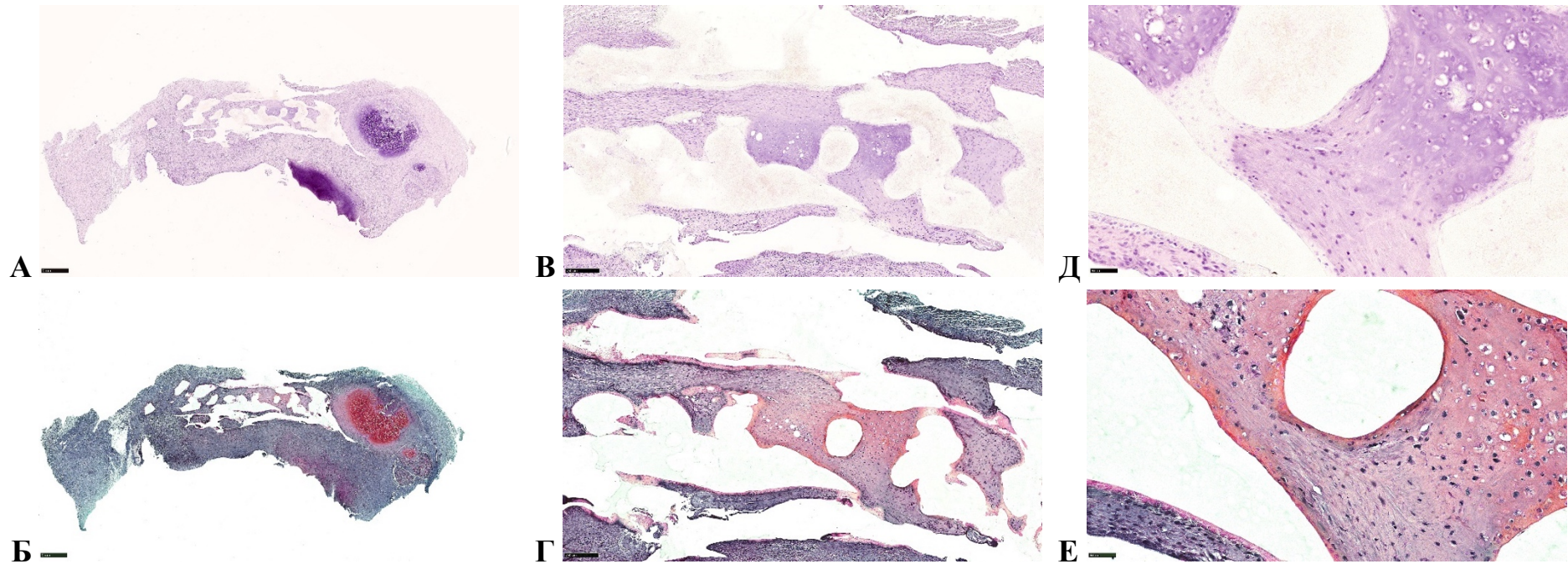


Рисунок 4.22 - Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ и сшитого коллагена через 1 месяц.

А: общий вид мениска с имплантатом. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 20х.

Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В розовый и красный цвет окрашиваются области, содержащие гликозаминогликаны. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 20х.

В: имплантат в окружении регенерирующей соединительной ткани при большем увеличении. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 100х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Регенерирующие фибробластоподобные клетки и отдельные скопления хондроцитоподобных клеток окрашены в слабо розовый цвет. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 100х.

Д: отдельные скопления округлых хондроцитоподобных клеток формируются в регенерирующей соединительной ткани вокруг фрагментов имплантата. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х.

Е: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Регенерирующие фибробластоподобные клетки и отдельные скопления хондроцитоподобных клеток окрашены в слабо розовый цвет. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х

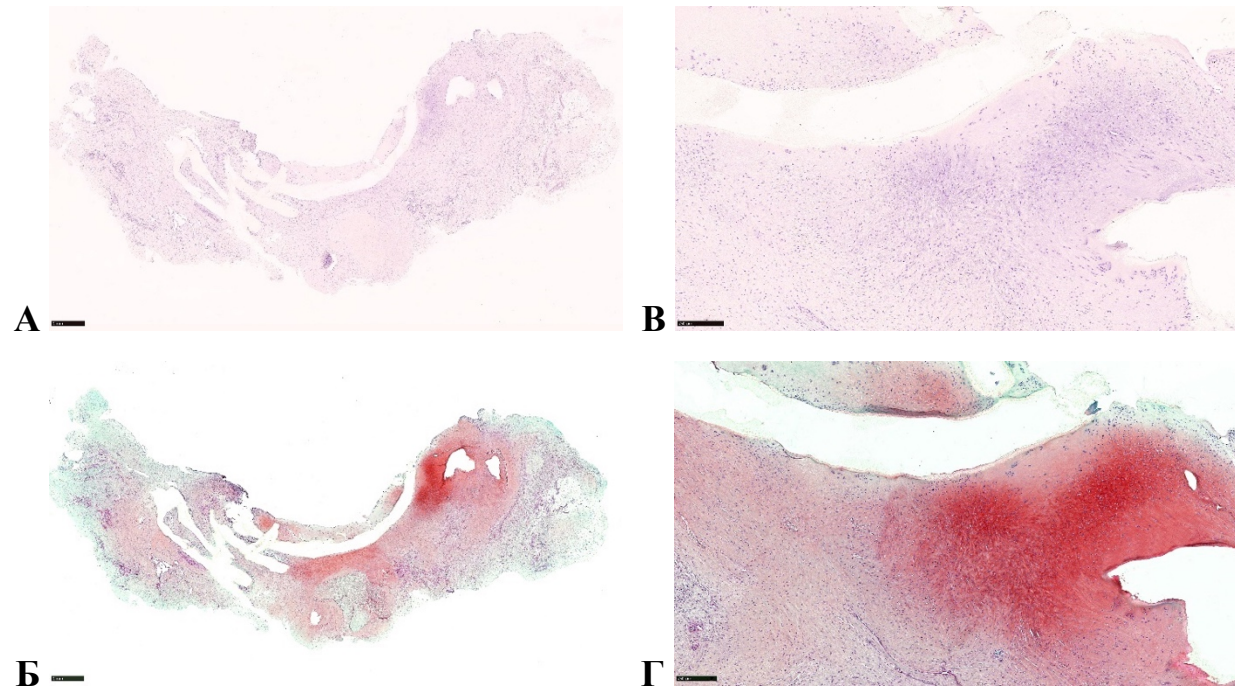


Рисунок 4.23 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ через 3 месяца.

А: Общий вид мениска с имплантатом. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 20х.
 Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В интенсивно красный цвет окрашиваются скопления хондроцитоподобных клеток, содержащие много гликозаминогликанов, а в розовый цвет – скопления фибробластоподобных клеток со сниженным уровнем гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 20х. В: имплантат в окружении регенерирующей хрящевой ткани при большем увеличении. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 100х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В интенсивно красный цвет окрашиваются скопления хондроцитоподобных клеток, содержащие много гликозаминогликанов, а в розовый цвет – диффузно расположенные фибробластоподобные клетки со сниженным уровнем гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 100х

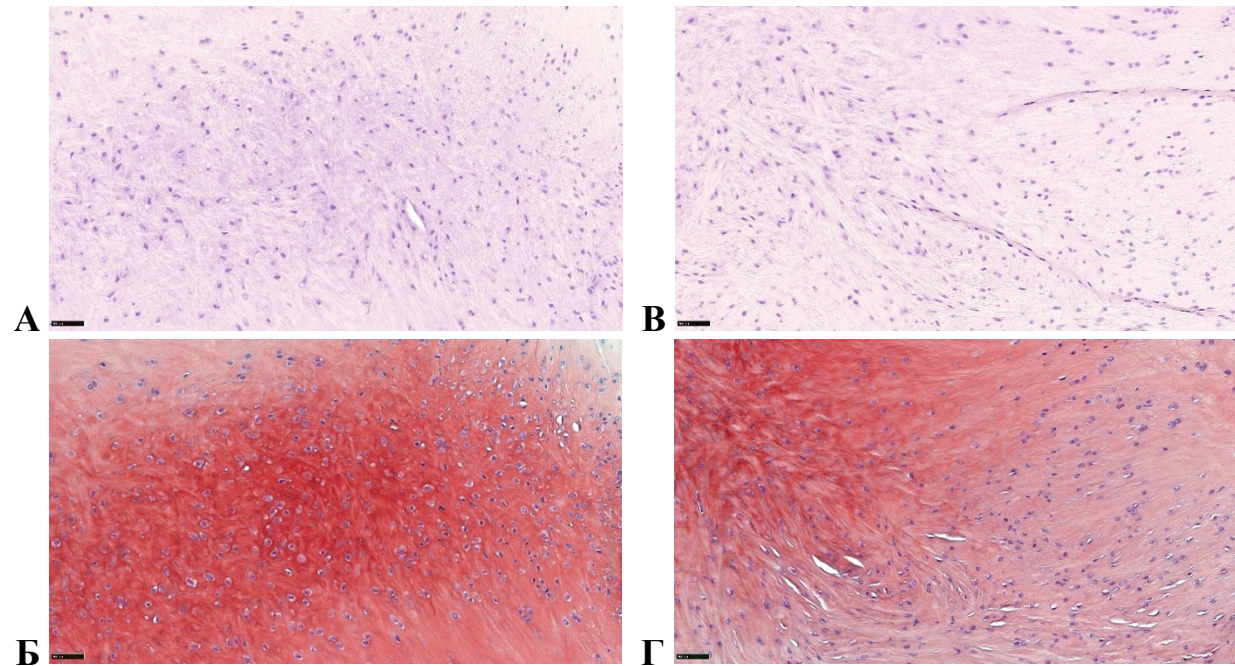


Рисунок 4.24 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ через 3 месяца.

А: отдельные скопления округлых хондроцитоподобных клеток формируются в регенерирующей ткани вокруг фрагментов имплантата и преимущественно во внутреннем слое мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Скопление хондроцитоподобных клеток окрашено в интенсивный красный цвет за счет высокого содержания гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х. В: диффузно расположенные фибробластоподобные клетки формируются в регенерирующей ткани вокруг фрагментов имплантата и преимущественно во внешнем слое мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Фибробластоподобные клетки окрашены в слабо розовый цвет из-за низкого содержания гликозаминогликанов и располагаются преимущественно во внешнем слое мениска. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х

ПКЛ-основа + сшитые гидрогели из коллагена: в этой группе регенерирующая ткань также представлена хрящевой тканью, состоящей из хондроцитоподобных и фибробластоподобных клеток. Но в отличие от предыдущей группы хондроцитоподобные клетки формируют уже более крупные и протяженные скопления вокруг фрагментов имплантата и четко во внутренней части мениска, тогда как слои фибробластоподобных клеток превалируют во внешней его части (Рисунок 4.25 А–Г). Слой хондроцитоподобных клеток, богатые гликозаминогликанами, окрашены в интенсивно красный цвет (Рисунок 4.26 Б), а слои фибробластоподобных клеток окрашиваются частично в красный, а частично в слабо розовый цвет из-за неравномерного содержания гликозаминогликанов (Рисунок 4.25 Д, Рисунок 4.26 Г). В этой группе уже наблюдается двусторонняя связь регенерирующей ткани с окружающими тканями мениска (Рисунок 4.25 А, Б).

Через 6 месяцев

ПКЛ-скаффолд: к этому временному сроку вся регенерирующая хрящевая ткань вокруг имплантата хорошо интегрирована в окружающие ткани мениска и окрашена в интенсивный красный цвет, что свидетельствует о высоком содержании в этих участках гликозаминогликанов (Рисунок 4.27 А–Г). Регенерирующая гиалиновая хрящевая ткань с хондроцитоподобными клетками занимает значительную площадь в мениске (Рисунок 4.28 А, Б), фиброзная хрящевая ткань с фибробластоподобными клетками также широко распространена (Рисунок 4.28 В, Г). Однако разные типы регенерирующей хрящевой ткани в мениске располагаются беспорядочно, не наблюдается четкого разграничения в их расположении во внутреннем и внешнем слоях мениска (Рисунок 4.27 В, Г).

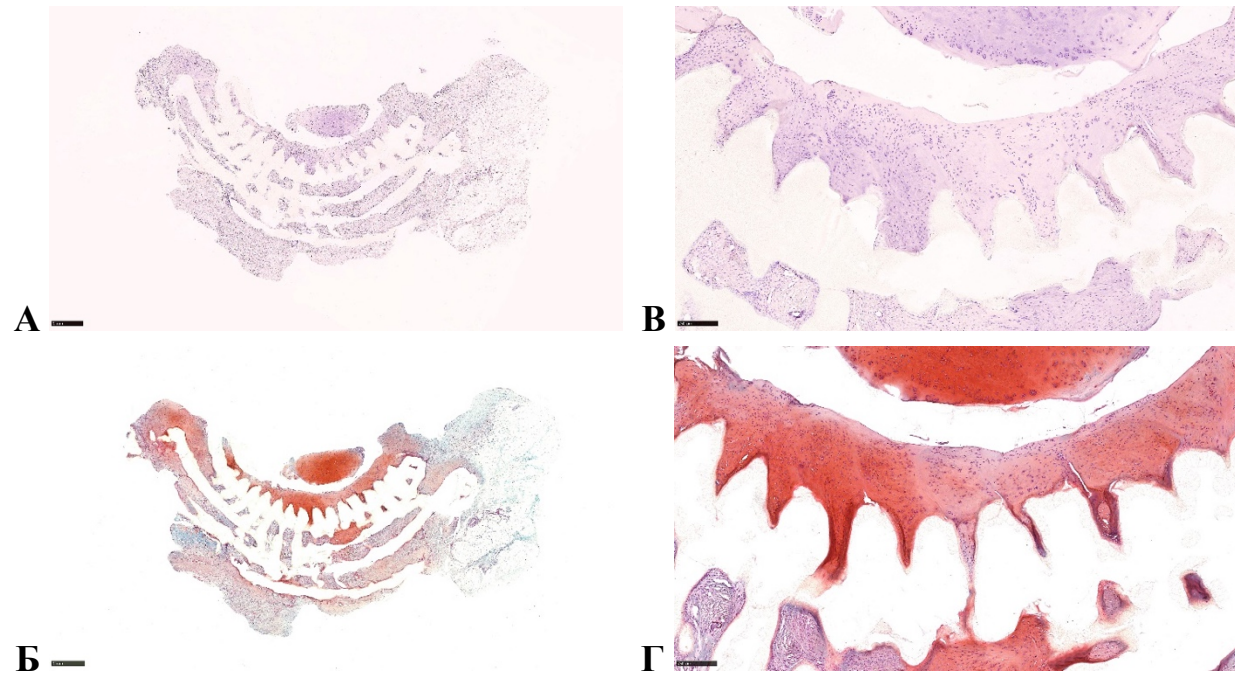


Рисунок 4.25 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ и сшитого коллагена через 3 месяца.

А: общий вид мениска с имплантатом, четко видны отличия регенерирующей хрящевой ткани по клеточному составу во внутренней и во внешней частях мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 20х.

Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В интенсивно красный цвет окрашиваются слои хондроцитоподобных клеток, богатые гликозаминогликанами, во внутренней части мениска, а в розовый и частично в красный цвет – скопления фибробластоподобных клеток со сниженным уровнем гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 20х.

В: имплантат в окружении регенерирующей хрящевой ткани при большем увеличении. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 100х.

Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В интенсивно красный цвет окрашиваются скопления хондроцитоподобных клеток или иногда фибробластоподобных клеток, содержащие много гликозаминогликанов, а в розовый цвет – фибробластоподобные клетки со сниженным уровнем гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 100х

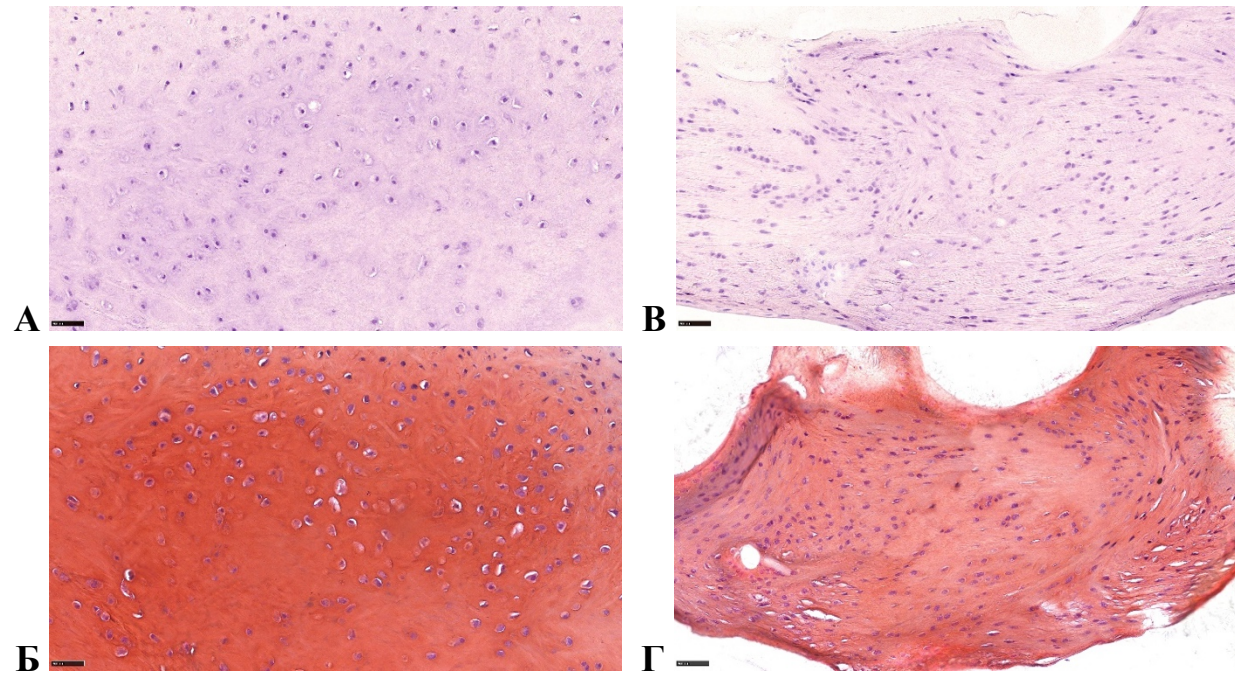


Рисунок 4.26 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ и сшитого коллагена через 3 месяца.

А: скопление округлых хондроцитоподобных клеток во внутренней части мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый.

Скопление хондроцитоподобных клеток окрашено в интенсивный красный цвет за счет высокого содержания гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х.

В: скопление фибробластоподобных клеток во внешнем слое мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый.

Фибробластоподобные клетки иногда окрашены в красный цвет из-за высокого содержания гликозаминогликанов.

Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х

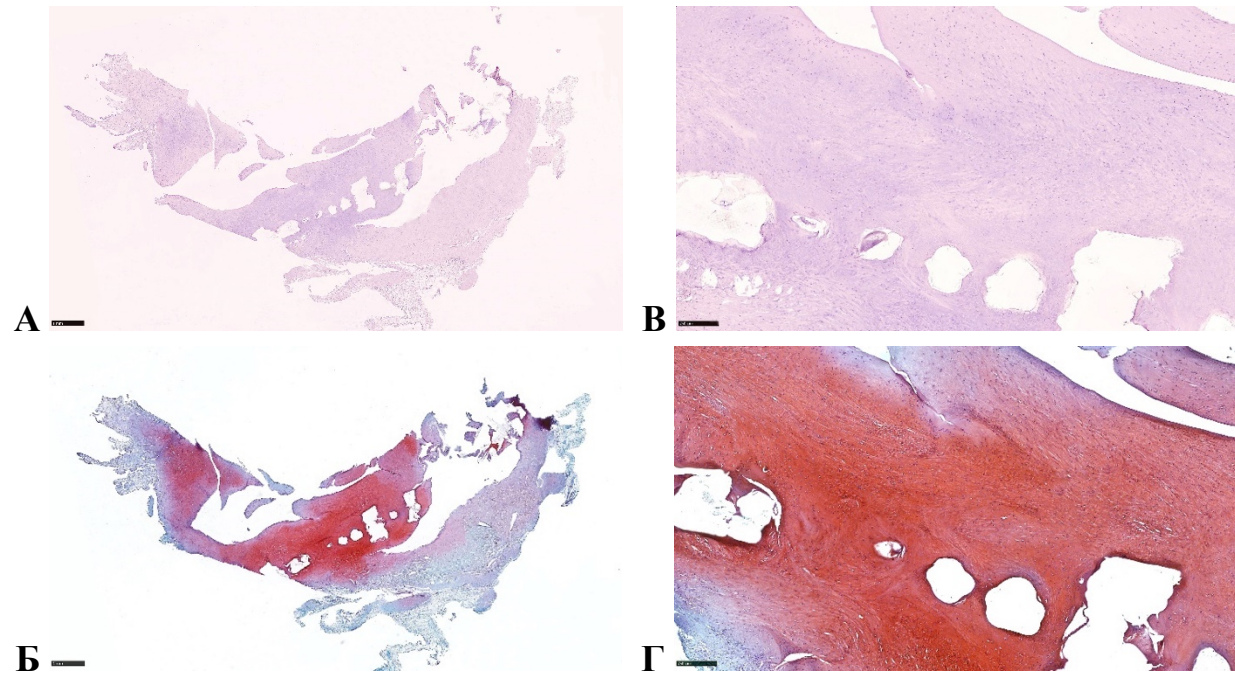


Рисунок 4.27 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ через 6 месяцев.

А: общий вид мениска с имплантатом, регенерирующая хрящевая ткань занимает большую площадь. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 20х. Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В красный цвет окрашена вся регенерирующая хрящевая ткань – как ее гиалиновая часть, так и фиброзная. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 20х. В: фрагменты имплантата в окружении регенерирующей хрящевой ткани смешанного состава с чередованием как гиалиновых и фиброзных слоев при большем увеличении. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 100х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В интенсивно красный цвет окрашиваются как скопления хондроцитоподобных клеток гиалиновой части хрящевого регенерата, так и фибробластоподобные клетки фиброзной части. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 100х

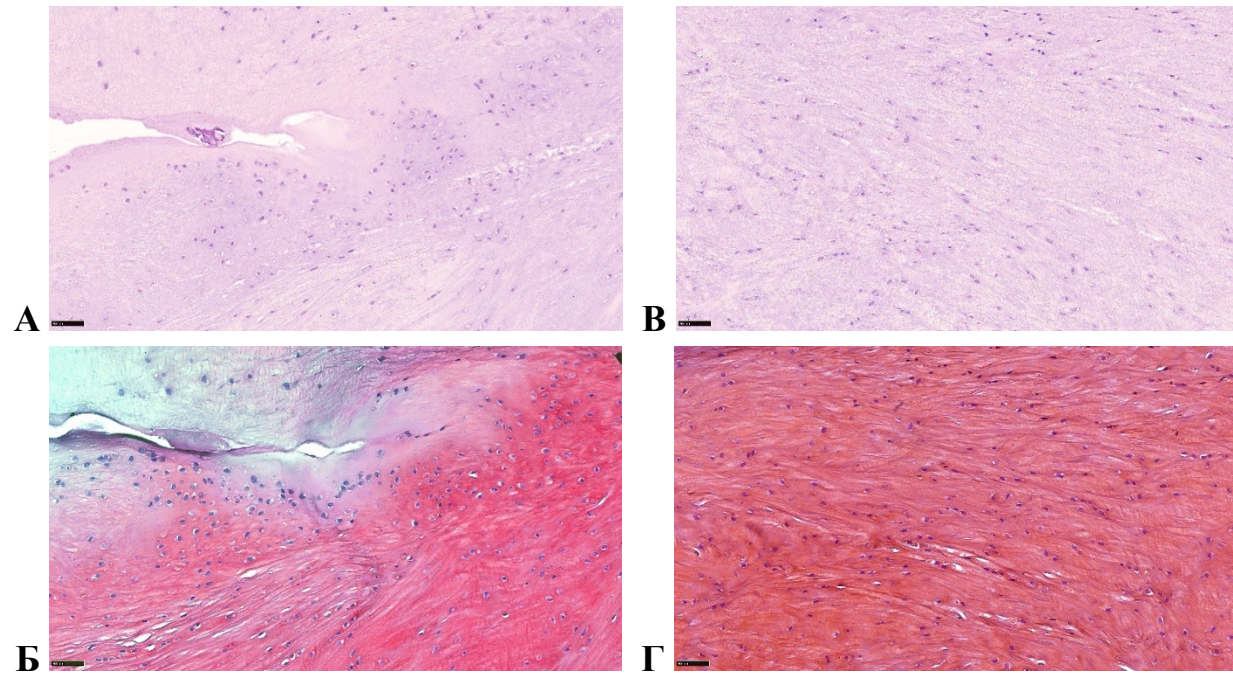


Рисунок 4.28 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ через 6 месяцев.

А: гиалиновая часть регенерирующей хрящевой ткани в виде скопления округлых хондроцитоподобных клеток.

Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Скопление хондроцитоподобных клеток окрашено в интенсивный красный цвет за счёт высокого содержания гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х. В: фиброзная часть регенерирующей хрящевой ткани в виде скопления фибробластоподобных клеток.

Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Фибробластоподобные клетки окрашены в красный цвет, что обусловлено высоким содержанием гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х

ПКЛ-основа + сшитые гидрогели из коллагена: в этой группе, как и в предыдущей, регенерирующая хрящевая ткань вокруг имплантата занимает значительную площадь в мениске и максимально интегрируется в окружающие его ткани, а также вся окрашена в ярко красный цвет, что свидетельствует о высоком содержании гликозаминогликанов (Рисунок 4.29 А–Г). Однако во всех образцах этой группы по сравнению с предыдущей группой отмечается четкое разделение в расположении разных типов регенерирующей хрящевой ткани в зависимости от части мениска. Так, регенерирующая гиалиновая хрящевая ткань с хондроцитоподобными клетками занимает исключительно внутреннюю часть мениска (Рисунок 4.29 А, Б, Рисунок 4.30 А, Б), а регенерирующая фиброзная хрящевая ткань с фибробластоподобными клетками располагается во внешней части мениска (Рисунок 4.29 В, Г, Рисунок 4.30 В, Г).

Таким образом, использование комбинированного скаффолда из ПКЛ и сшитого коллагена дает гораздо лучшие результаты для регенерации ткани мениска по сравнению с ПКЛ-скаффолдом. В случае комбинированного скаффолда на всех временных сроках быстрее происходит появление скоплений хондроцитоподобных клеток, они занимают гораздо большую площадь и содержат более высокий уровень гликозаминогликанов, чем в аналогичных образцах со скаффолдом из ПКЛ. Кроме того, к 6 месяцу хрящевой регенерат вокруг комбинированного скаффолда, в отличие от скаффолда ПКЛ, достигает высокой степени зрелости и по морфологическим характеристикам максимально приближен к характеристикам нормальной хрящевой ткани мениска. Так, хрящевой регенерат представлен во внутренней части мениска богатыми гликозаминогликанами крупными областями гиалиновой хрящевой ткани с хондроцитоподобными клетками, а во внешней части мениска – зонами фиброзной хрящевой ткани также с высоким содержанием гликозаминогликанов. Следовательно, можно утверждать, что комбинированный скаффолд лучше повлиял на регенерацию ткани мениска по сравнению со скаффолдом ПКЛ (Таблица 4.18, Рисунки 4.31 и 4.32).

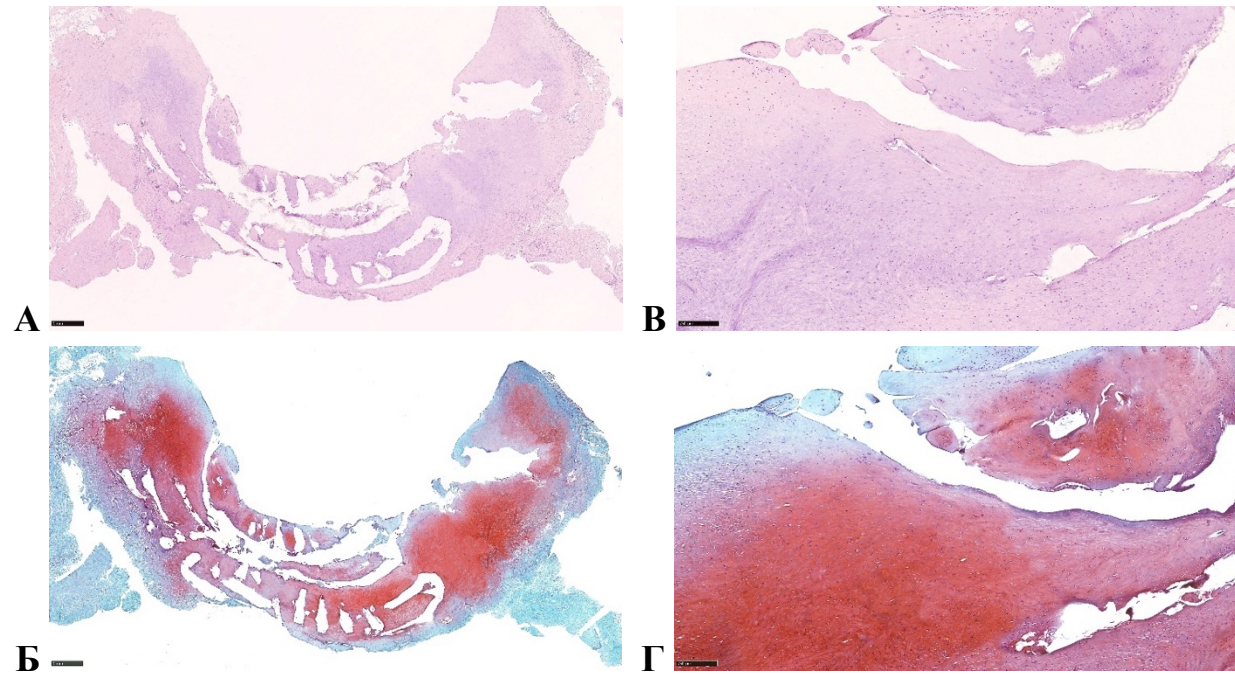


Рисунок 4.29 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ и сшитого коллагена через 6 месяцев.

А: общий вид мениска с имплантатом, регенерирующая хрящевая ткань занимает большую площадь и четко видны отличия по ее морфологии во внутренней и внешней частях мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 20х. Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В красный цвет окрашена вся регенерирующая хрящевая ткань, как ее гиалиновая часть, так и фиброзная. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 20х. В: фрагменты имплантата в окружении регенерирующей хрящевой ткани, при этом гиалиновая хрящевая ткань занимает внутреннюю часть мениска, а фиброзная хрящевая ткань расположена преимущественно в его внешней части. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 100х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. В интенсивно красный цвет окрашиваются как скопления хондроцитоподобных клеток гиалиновой части хрящевого регенерата, так и фибробластоподобные клетки фиброзной части. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 100х

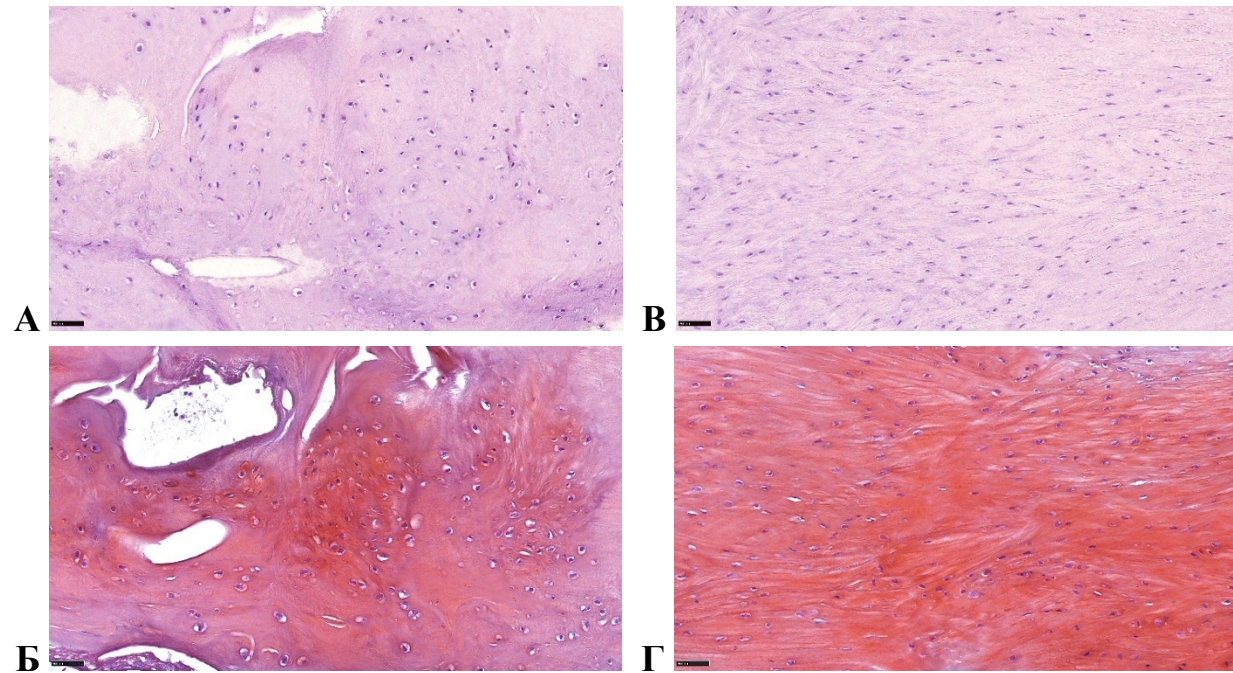


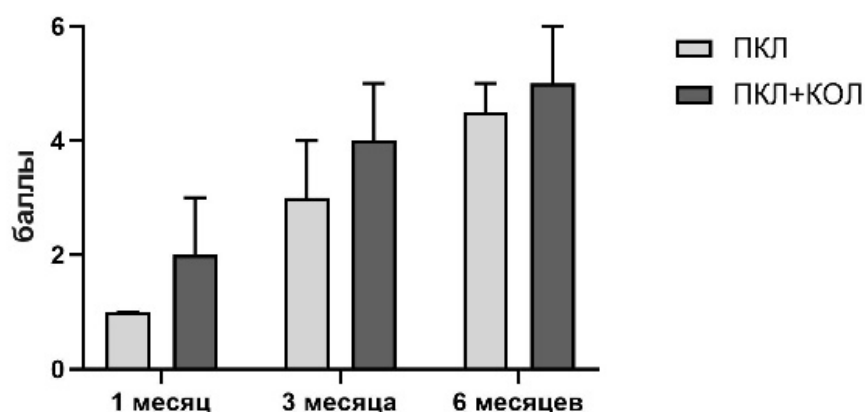
Рисунок 4.30 – Регенерация ткани мениска при имплантации скаффолда из ПКЛ и сшитого коллагена через 6 месяцев.

А: гиалиновая часть регенерирующей хрящевой ткани в виде скопления округлых хондроцитоподобных клеток во внутренней части мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х.

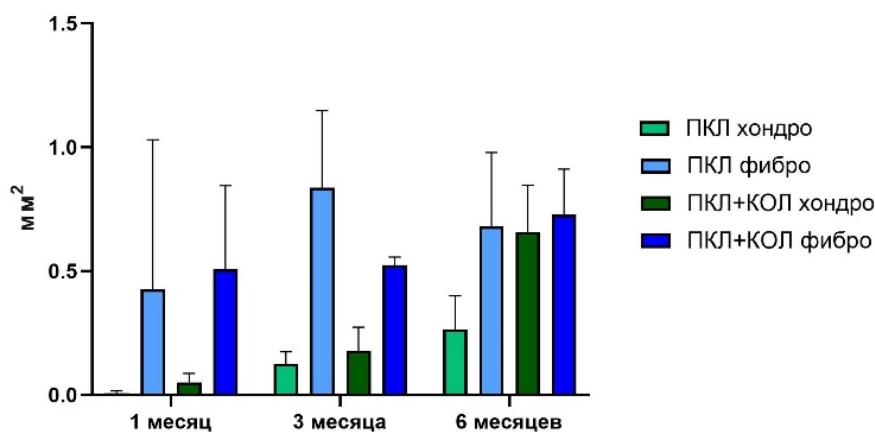
Б: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Скопление хондроцитоподобных клеток окрашено в интенсивный красный цвет за счет высокого содержания гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х. В: фиброзная часть регенерирующей хрящевой ткани в виде скопления фибробластоподобных клеток во внешней части мениска. Светлопольная микроскопия, окраска гематоксилином-эозином, ув. 400х. Г: тот же участок при окраске сафранин О - метиловый зеленый. Фибробластоподобные клетки окрашены в красный цвет, что обусловлено высоким содержанием гликозаминогликанов. Светлопольная микроскопия, окраска сафранин О - метиловый зеленый, ув. 400х

Таблица 4.18 – Анализ результаты по шкале Ischida в зависимости от вида имплантата

Вид импланта	Результаты по классификации Ischida (в баллах)						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Скаффолд ПКЛ	4,00 (n=4)	3,75–4,00	4,50 (n=4)	4,00–5,00	5,00 (n=4)	4,75–5,00	0,116
Комбинированный скаффолд	3,50 (n=4)	3,00–4,00	4,50 (n=4)	4,00–5,00	6,00 (n=4)	5,75–6,00	0,022*
p	0,495		1,000		0,040*		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							



А



Б

Рисунок 4.31 – Морфометрический анализ влияния состава имплантата на регенерацию хрящевой ткани мениска. Балльная оценка по Ishida (А) и количественная оценка размеров площадей хрящевых регенератов из хондроцитоподобных и фибробластоподобных клеток (Б) в ткани мениска. Данные представлены в виде Me и 95% ДИ (А), а также в виде M и SD (Б)

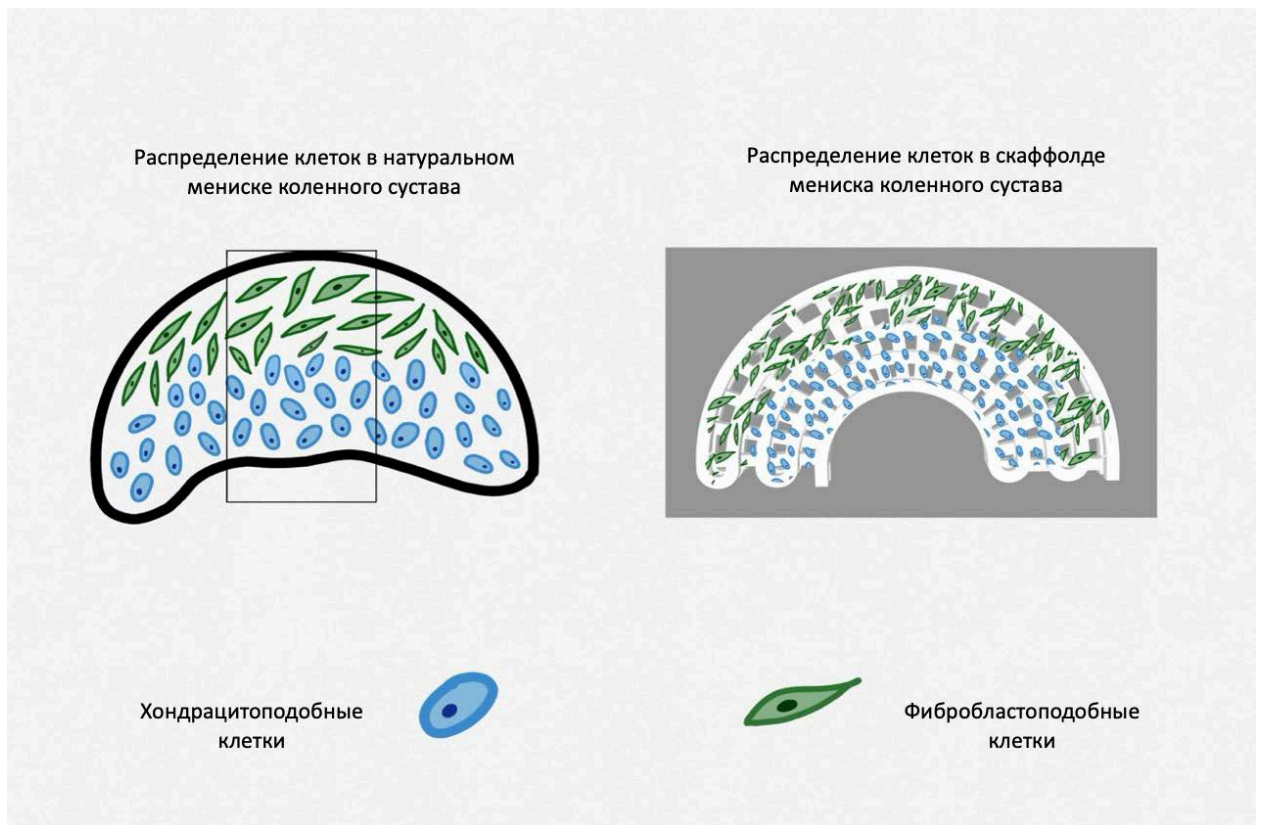


Рисунок 4.32 – Распределение клеток в натуральном мениске коленного сустава и в имплантированном в коленный сустав кролика скаффолда мениска

Гистологическая оценка по шкале Mankin. При сопоставлении результатов исследования по шкале Mankin не было определено статистически значимой разницы в зависимости от вида импланта ($p = 0,210$) (используемый метод: F-критерий Фишера).

В группе особей, которые получали ПКЛ-скаффолды, наблюдалось диффузное клонирование хондроцитов и трещины в переходной или радиальной зоне с небольшим уменьшением окрашивания туберкулином. Все это указывает на менее выраженную деградацию хряща, чем в группе менискэктомированных особей.

Самые высокие средние показатели по шкале Mankin на каждый момент времени были обнаружены в группе менискэктомированных особей и со временем деградация хрящевой ткани прогрессировала (Таблица 4.19, Рисунок 4.33).

Таблица 4.19 – Количественная оценка суставных поверхностей по классификации Mankin в зависимости от вида имплантата

Вид импланта	Классификация по Mankin						p
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц		
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	
Менискэктомия	7,50	7,00 – 8,00	8,50	8,00 – 9,00	10,50	10,00 – 11,25	0,001* p 1 мес. –6 мес. = 0,008
Скаффолд ПКЛ	6,00	5,75 – 6,75	8,00	7,00 – 9,25	9,50	8,75 – 9,25	0,024*
Комбинированный скаффолд	7,00	6,25 – 7,25	8,00	7,75 – 8,25	9,00	8,75 – 10,25	0,018*
p	0,408		0,712		0,070		–
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)							

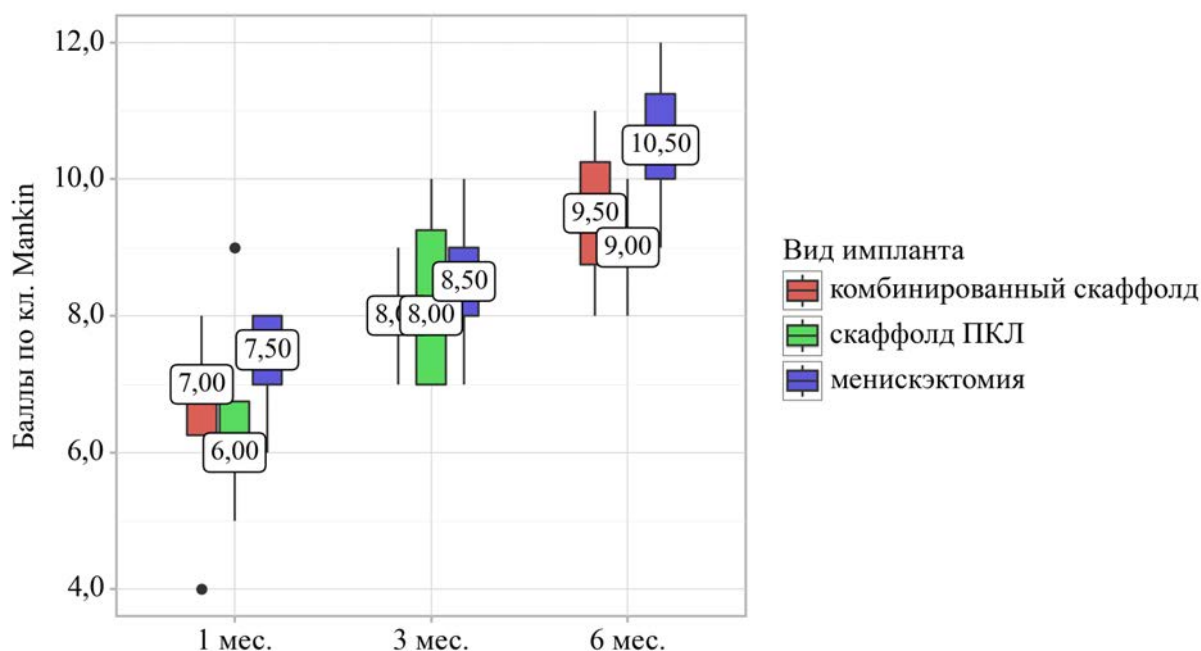


Рисунок 4.33 – Количественная оценка суставных поверхностей по классификации Mankin в зависимости от вида имплантата

При сравнении показателей по классификации Mankin среди животных, прооперированных длинным парapatеллярным доступом или коротким медиальным доступом, на сроках 1 месяц ($p = 0,854$), 3 месяца ($p = 0,479$) и 6 месяцев ($p = 0,329$) не установлены статистически значимые различия (используемый метод: t-критерий Стьюдента).

При проведении внутригруппового анализа в зависимости от хирургического доступа были установлены статистически значимые изменения на каждом сроке ($p < 0,001$) (используемый метод: критерий Фишера с повторными измерениями) (Таблица 4.20).

Таблица 4.20 – Анализ динамики баллов по классификации Mankin в зависимости от вида хирургического доступа

Вид хирургического доступа	Результаты по Mankin					
	1-й месяц		3-й месяц		6-й месяц	
	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃	Me	Q ₁ – Q ₃
Длинный парапателлярный	7,00 ± 1,51 (n=8)	5,74 – 8,26	8,50 ± 1,20 (n=8)	7,50 – 9,50	9,62 ± 1,19 (n=8)	8,63 – 10,62
Короткий медиальный	6,88 ± 1,13 (n=8)	5,93 – 7,82	8,12 ± 0,83 (n=8)	7,43 – 8,82	10,25 ± 1,28 (n=8)	9,18 – 11,32
p	0,854		0,479		0,329	
Примечание: * – различия показателей статистически значимы (p <0.05)						

Результаты проведенных экспериментов демонстрируют, что комбинированный скаффолд, состоящий из поликапролактоновой основы и импрегнированный коллагеновыми гидрогелями различных типов, является наиболее эффективной и безопасной моделью среди предложенных.

Созданные скаффолды обладают необходимыми механическими параметрами, позволяющими выдерживать значительные нагрузки. Это способствует регенерации ткани мениска, которая по своей гистологической структуре максимально приближается к нативной ткани мениска.

В ходе экспериментов была отмечена высокая степень интеграции искусственной конструкции с окружающими тканями, что минимизирует риск осложнений и ускоряет процесс заживления. Полученные данные подтверждают, что предложенная модель скаффолда может быть успешно применена в регенеративной медицине для восстановления поврежденных тканей мениска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В период с 2021 по 2024 год было проведено экспериментальное исследование, которое включало четыре последовательных этапа, направленных на создание и тестирование скаффолдов для регенерации менисковой ткани.

На первом этапе исследования проводился подбор оптимального материала и технологии печати скаффолда мениска с использованием FDM 3D-принтера. Выполнены испытания *in vitro*, включающие механические тесты на сжатие и растяжение изготовленных скаффолдов. В рамках эксперимента изучались ПКЛ-скаффолды, напечатанные при различных температурных режимах, а также их комбинации с коллагеновыми гидрогелями I и II типов. Результаты механических испытаний продемонстрировали, что выбранный гибридный каркас обладает значительными преимуществами, обеспечивая средние значения модуля Юнга на растяжение (12 МПа) и показатели прочности на сжатие (29 МПа), сопоставимые с характеристиками нативного мениска ($p < 0,001$). Дополнительно была проведена оценка структуры скаффолдов, включая толщину балок и размер пор с использованием СЭМ, а также анализ гидрофильности образцов как в сухом состоянии, так и после погружения в физиологический раствор на 30 минут.

На основании полученных данных было определено, что оптимальный температурный диапазон для печати ПКЛ-скаффолдов составляет 130–140 градуса Цельсия ($p < 0,001$). Применение параметров печати на FDM 3D-принтере обеспечивает высокую точность формирования балок и пор, что критически важно для достижения необходимых механических характеристик каркаса мениска ($p < 0,001$).

На втором этапе исследования была проведена оценка цитотоксичности скаффолдов, которые были разделены на три группы: ПКЛ, ПКЛ в комбинации с коллагеновыми гидрогелями, сшитыми глутаровым альдегидом, и ПКЛ с несшитыми гидрогелями. Каждая группа включала по шесть образцов. Для анализа жизнеспособности клеток на поверхность скаффолдов высевались фибробласты человека, а их жизнеспособность оценивалась спустя 24 и 72 часа. Результаты теста

на цитотоксичность продемонстрировали, что фибробласты сохраняли высокую жизнеспособность (более 90%) на комбинированных скаффолдах, содержащих как сшитые, так и несшитые коллагеновые гидрогели ($p < 0,001$). Кроме того, комбинация ПКЛ основы с коллагеновыми гидрогелями, сшитыми глютаровым альдегидом, продемонстрировала наилучшую цитосовместимость среди всех исследуемых групп. Эта группа показала прирост клеточной массы на 65% спустя три дня после начала культивации, что свидетельствует о ее высоком потенциале для применения в тканевой инженерии ($p < 0,001$).

На третьем этапе исследования для определения воспалительных реакций и степени деградации материалов была проведена подкожная имплантация скаффолдов 12 крысам породы Wistar. Животные были разделены на две группы в соответствии со сроками выведения из эксперимента – 2 недели и 1 месяц после имплантации. После эвтаназии извлеченные скаффолды подвергались гистологическому анализу. Гистологическая картина скаффолдов после имплантации не выявила выраженной воспалительной реакции как со стороны ПКЛ основы, так и ее комбинаций с коллагенами, сшитыми и несшитыми глютаровым альдегидом. В ходе анализа количества макрофагов на 14-е сутки ($p = 0,135$) и 30-е сутки ($p = 0,343$) не удалось выявить статистически значимых различий. Было отмечено формирование фиброзоподобной ткани, способной частично замещать ПКЛ основу скаффолдов, что свидетельствует о хорошей биосовместимости материала. Сшитые глютаром коллагеновые гидрогели, нанесенные на ПКЛ основу, сохранялись в имплантатах спустя 30 суток после трансплантации. Это указывает на их потенциально длительное присутствие и устойчивость в биологической среде, что делает такие материалы перспективными для дальнейшего использования в доклинических этапах.

Для оценки функциональности и регенеративных свойств скаффолдов проведен четвертый этап исследования *in vivo* на 24 кроликах породы Советская Шиншилла. Животные были разделены на экспериментальную и контрольную группы, контрольные точки — 30-й, 90-й и 180-й день после операции. В течение двух недель после вмешательства оценивали качество жизни животных. На каждой

контрольной точке из эксперимента выводили по 4 кролика из каждой группы. После эвтаназии проводилась экзартикуляция коленного сустава для МРТ коленных суставов кроликов, механических, визуальных и гистологических исследований скаффолдов и суставных поверхностей. Результаты экспериментов *in vivo*, проведенных на моделях кроликов породы Советская шиншилла, демонстрируют значительный потенциал скаффолдов из ПКЛ и гибридных каркасов из ПКЛ, дополненных коллагеновыми гидрогелями, в регенерации тканей мениска.

В ходе исследования была отмечена хорошая механическая характеристика и способность формирования неоменисковой ткани после имплантации обоих видов скаффолдов. Однако комбинированный скаффолд проявил более высокие механические параметры в сравнении с ПКЛ аналогом ($p < 0,001$). На 6-м месяце после имплантации комбинированный скаффолд продемонстрировал существенно лучшие показатели механической прочности при индентации (2,9 МПа), превосходя результаты группы скаффолда из ПКЛ. Кроме того, анализ модуля Юнга при растяжении выявил заметное превосходство гибридного каркаса. Так, на 1-м и 3-м месяцах после имплантации модуль Юнга составил 3,5 МПа и 4,4 МПа соответственно, что значительно превосходит аналогичные показатели ПКЛ-скаффолда. Таким образом, использование гибридного каркаса из ПКЛ, дополненного коллагеновыми гидрогелями, позволяет достичь лучших биомеханических характеристик и способствует более эффективной регенерации ткани мениска ($p < 0,001$).

В рамках проведенного исследования следует предложить применение короткого медиального хирургического доступа для имплантации скаффолдов мениска, что обусловлено его преимуществами в предотвращении дислокации имплантата. Результаты гистологического анализа имплантированных скаффолдов показали, что техника хирургического доступа не оказывает значимого влияния на морфологические характеристики имплантатов. Вместе с тем статистически значимые различия ($p < 0,040$) в результатах коррелировали с используемой

комбинацией материалов скаффолда, что подтверждает важность оптимизации состава имплантатов.

Применение короткого медиального доступа сопровождалось снижением болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде. Так, баллы по шкале гримас кроликов оказались ниже на 15% ($p < 0,001$), а выраженность отека коленного сустава уменьшилась на 10% во всех временных точках раннего послеоперационного наблюдения ($p < 0,001$). Эти данные указывают на более щадящий характер выбранного доступа, что может улучшить комфорт животных в первые недели после операции. В последующем, начиная с позднего послеоперационного периода, показатели по шкале гримас кроликов оставались стабильными и не изменялись вплоть до окончания эксперимента.

При анализе отдаленных сроков послеоперационного периода не было выявлено статистически значимых различий в количественных классификациях между двумя хирургическими доступами. Это свидетельствует о том, что выбор короткого медиального доступа обеспечивает сопоставимые результаты по эффективности и качеству регенерации тканей, сохраняя при этом преимущества в раннем послеоперационном периоде.

В позднем послеоперационном периоде функциональная активность задних конечностей кроликов оценивалась с использованием шкалы подвижности BBB, а также по углу примыкания задних конечностей. Полученные результаты демонстрируют, что в группе с имплантированными скаффолдами показатели подвижности были значительно выше по сравнению с менискэктомированными особями на 1-м и 6-м месяцах после имплантации ($p < 0,023$ и $p < 0,003$). Кролики с имплантатами проявляли лучшую способность к передвижению, что подтверждается более высокими баллами по шкале BBB. Кроме того, угол примыкания задних конечностей у кроликов с имплантированными скаффолдами превышал аналогичный показатель у животных из контрольной группы (менискэктомированных) на 20% ($p = 0,023$). Это указывает на улучшенную амплитуду движений задних конечностей, что свидетельствует о восстановлении функциональной активности суставов и мышечно-связочного аппарата у данной

категории животных. Данные результаты подтверждают, что использование имплантируемых скаффолдов способствует значительному улучшению функциональных показателей суставов и конечностей в сравнении с менискэктомией, обеспечивая более высокую степень восстановления двигательной активности.

Результаты гистологического исследования, проведенного с использованием шкалы Ishida, показали, что комбинированные скаффолды существенно превосходят ПКЛ-скаффолды в эффективности регенерации тканей мениска в отдаленные сроки. На 6-м месяце после имплантации комбинированные скаффолды демонстрировали на 17% более высокие баллы по шкале Ishida по сравнению с ПКЛ-скаффолдами, что свидетельствует о лучшей интеграции материала и способности восстанавливать структуру мениска ($p=0,022$). В более ранние временные промежутки (первый и третий месяцы) разница между двумя группами отсутствовала ($p=0,495$ и $p=1$), что может быть связано с постепенным проявлением преимуществ комбинированных материалов на поздних этапах регенерации. Помимо этого, комбинированный скаффолд проявил на 10% более выраженный хондропротекторный эффект в предотвращении дегенеративных изменений суставного хряща, что подтверждено результатами оценки по шкале Mankin. Этот показатель подчеркивает способность комбинированного скаффолда снижать риск дегенерации хрящевых тканей, поддерживая их морфофункциональную целостность, в то время как ПКЛ-скаффолды обеспечивали менее выраженную защиту. Таким образом, комбинированные скаффолды демонстрируют превосходство над ПКЛ аналогами как в отношении регенерации тканей мениска, так и в аспекте защиты суставного хряща.

Данное диссертационное исследование может подтвердить, что гибридный каркас на ПКЛ основе с содержанием коллагеновых гидрогелей разных типов может успешно способствовать регенерации всего мениска, переносить должную механическую нагрузку и защищать суставной хрящ от повреждений. Изготовленное изделие может быть рекомендовано для клинической апробации.

ВЫВОДЫ

1. При изготовлении скаффолда мениска, имплантируемого в коленный сустав лабораторного животного, оптимальной техникой является его печать из поликапролактона на 3D-принтере на основе 3D-модели при температуре экструзии 130–140°C и размере сопла 0,2 мм. Механическая прочность таких скаффолдов составила 30 МПа при индентации и 12 МПа при растяжении, что сопоставимо с нативным мениском кролика как экспериментальной модели.
2. Поликапролактоновые скаффолды с коллагеновыми гидрогелями не имеют контактной цитотоксичности для фибробластов человека и способствуют увеличению клеточной пролиферации на 15% к третьим суткам культивации. На 30-й день после их подкожной имплантации у крыс не наблюдалось воспалительных реакций, а в поры скаффолда прорастала рыхлая соединительная ткань.
3. При имплантации скаффолда мениска через короткий медиальный доступ дислокации каркасов не отмечено, а боль и отек коленных суставов в раннем послеоперационном периоде снизились на 10 %, тогда как после имлантации через длинный парapatеллярный доступ с вывихом надколенника дислокация скаффолдов через 3 месяца наступила у 33% особей. Кроме того, через 6 месяцев двигательные способности по шкале BBB после имплантации скаффолда через короткий медиальный доступ были лучше на 1 пункт.
4. Использование комбинированного скаффолда на поликапролактановой основе, импрегнированного коллагеновым гидрогелем, продемонстрировало на 17% более высокий регенераторный потенциал по шкале Ishida и на 10% меньше повреждений суставного хряща по шкале Mankin по сравнению с имплантацией скаффолда из поликапролактона.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. По результатам проведенного эксперимента было доказано, что имплантация разработанного скаффолда мениска на поликапролактановой основе, импрегнированного коллагеновым гидрогелем, является безопасной и обладает высоким регенераторным потенциалом, что позволяет рекомендовать данный скаффолд для дальнейших испытаний на крупных животных с целью последующего использования в клинической практике для замещения дефектов менисков коленного сустава.
2. При изготовлении скаффолда мениска для персонифицированного клинического применения его следует изготавливать по индивидуальной 3D-модели с использованием технологий 3D-печати.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

95% ДИ – 95% доверительный интервал

КУС – контактный угол смачивания

МПК – момент приведения колена

МРТ – магнитно-резонансная томография

ОА – остеоартрит

ПКЛ – поликапролактон

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

BBB – Basso, Beattie and Bresnahan Scale; Шкала Бассо, Бэтти и Бресна, модифицированная шкала оценки опорно-двигательного аппарата для кроликов после ортопедической операции

CMI – Collagen Meniscal Implant, скаффолд на коллагеновой основе

FDM – Fused Deposition Modeling, моделирование методом наплавленного осаждения

М – средняя арифметическая величина

Me – медиана

PBS – Phosphate Buffered Saline, фосфатно-солевой буфер

PRP – Platelet Rich Plasma, обогащенная тромбоцитами плазма

Q1 – Q3 – нижний и верхний квартиль

SD – стандартное отклонение

WORMS – Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score, шкала оценки магнитно-резонансной томографии целого органа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуразаков, У.А. Анатомо-функциональные особенности менисков и причины их повреждений / У.А. Абдуразаков, Е.Н. Набиев, А.Р. Байзаков // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2020. – № 1. – С. 298–302.
2. Аддитивные технологии у пациентов с обширными дефектами костей нижних конечностей / В.П. Волошин, А.Г. Галкин, С.А. Ошкуков [и др.] // Гений ортопедии. – 2021. – Т. 27. – № 2. – С. 227–231.
3. Актуальные аспекты лечения повреждений менисков коленного сустава / Э.Н. Безуглов, В.Ю. Хайтин, А.В. Токарева [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15. – № 2. – С. 294–300.
4. Анатомия структур коленного сустава при деформирующем артрозе по данным прижизненных и поствитальных исследований / А.А. Семенов, И.В. Гайворонский, В.В. Хоминец [и др.] // Морфологические ведомости. – 2019. – Т. 27. – № 3. – С. 32–38.
5. Антошин, А.А. Биodeградируемые матрицы на основе фибриллярного коллагена для аугментационной уретропластики: дис. ... канд. биол. наук: 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия / Антошин Артем Анатольевич; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2023. – 167 с.
6. Артроскопическая менискэктомия у больных гонартрозом: разрыв между доказательной медициной и мнением практикующего специалиста / А.В. Сараев, Н.Н. Корнилов, Т.А. Куляба [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2022. – Т. 28. – № 4. – С. 5–20.
7. Артроскопия коленного сустава (шов мениска) / Б.А.С. Альросан, Ф.Л. Лазко, Е.А. Беляк [и др.] // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2020. – № 12. – С. 163–166.
8. Артроскопия при гонартрозе в XXI веке: систематический обзор актуальных исследований высокого уровня доказательности и рекомендаций

профессиональных сообществ / А.В. Сараев, Т.А. Куляба, М.Ш. Расулов, Н.Н. Корнилов // Травматология и ортопедия России – 2020. – Т. 26. – № 4. – С. 150–162.

9. Брюханов, А.В. Комплексное применение лучевых методов диагностики при обследовании больных с травматическими повреждениями коленных суставов / А.В. Брюханов, М.А. Клыжин // Сибирский медицинский журнал (г. Томск). – 2008. – Т. 23. – № 2. – С. 20–24.

10. Влияние двух- и пятикомпонентной мембран на скорость регенерации хряща в эксперименте. Обоснование рационального выбора лабораторных животных для эксперимента / Н.О. Белов, С.Г. Раденска-Лоповок, А.В. Лычагин [и др.] // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2023. – № 3 (53). – С. 7–17.

11. Гончарук, Ю.Р. Оптическая спектроскопия в диагностике интраартикулярных повреждений коленного сустава: дис. ... канд. мед. наук: 3.1.8. Травматология и ортопедия; 1.5.22.Клеточная биология / Гончарук Юлия Романовна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2023. – 166 с.

12. Диагностика внутрисуставных повреждений коленного сустава в остром периоде травмы при помощи магнитно-резонансной томографии / А.Б. Футрык, К.В. Головатенко-Абрамов, И.И. Корочкина [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2002. – № 4. – С. 73–78.

13. Елизарова, В.В. Экспериментальное обоснование применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани с целью регенерации перфорации перегородки носа: дис. ... канд. мед. наук: 3.1.3. Оториноларингология; 1.5.22. Клеточная биология / Елизарова Виктория Викторовна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2024. – 118 с.

14. Зазирный, И.М. Трансплантация мениска коленного сустава: современное состояние проблемы. Обзор литературы. Часть 1 / И.М. Зазирный, Р.Я. Шмигельски // Травма. – 2015. – Т. 16. – № 6. – С. 81–94.

15. Зазирный, И.М. Трансплантация мениска коленного сустава: современное состояние проблемы. Обзор литературы. Часть 2 / И.М. Зазирный, Р.Я. Шмигельски // Травма. – 2015. – Т. 16. – № 6 – С. 95–102.
16. Зедгенидзе, И.В. Лечебная тактика при повреждениях менисков / И.В. Зедгенидзе, В.М. Прохоренко // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2011. – № 4–1 (80). – С. 76–79.
17. Кашеварова, Н.Г. Остеоартроз коленных суставов: факторы риска прогрессирования заболевания при пятилетнем проспективном наблюдении: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.22 – Ревматология / Кашеварова Наталья Гавриилевна; ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии» РАМН. – Москва, 2014. – 136 с.
18. Клеточные реакции на трехмерные матрицы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати / Т.В. Дружинина, С.Я. Талалаев, Н.П. Закиров [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – Т. 15. – № 5. – С. 16–29.
19. Козадаев, М.Н. Особенности изменений микроциркуляции при субкутанной имплантации скаффолдов на основе поликапролактона и гидроксиапатита: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.03 – Патологическая физиология / Козадаев Максим Николаевич; ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». – Москва, 2017. – 127 с.
20. Копелев, П.В. Сравнительный анализ трехмерных полилактидных скаффолдов различной пористости, предназначенных для восстановления хрящевой ткани / П.В. Копелев, Ю.А. Нащекина, С.А. Александрова // Бюллетень инновационных технологий. – 2018. – Т. 27. – № 3 (7). – С. 25–31.
21. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии / Д.С. Кузнецова, П.С. Тимашев, В.Н. Баграташвили, Е.В. Загайнова // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6. – № 4. – С. 201–212.

22. Курганова, Н.А. Функциональная анатомия коленного сустава, его биомеханика и протезирование / Н.А. Курганова // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2019. – Т. 9. – № 10. – С. 430.
23. Малаев, И.А. Аддитивные технологии: применение в медицине и фармации / И.А. Малаев, М.Л. Пивовар // Вестник фармации. – 2019. – № 2 (84). – С. 98–107.
24. Материалы для создания тканеинженерных конструкций методом 3D-биопечати при восстановлении хрящевой и мягких тканей / Н.В. Аргучинская, Е.Е. Бекетов, Е.В. Исаева [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 1. – С. 60–74.
25. Нетканые материалы на основе поликапролактона для тканевой инженерии: выбор структуры и способа заселения / И.В. Арутюнян, Т.Х. Тенчурина, Е.Ю. Кананыхина [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – № 1. – С. 62–71.
26. Новый способ определения диагностических параметров суставного хряща: от теории к практике (клинический пример) / Б.Д. Райков, К.М. Азаркин, А.В. Лычагин, Ю.Р. Гончарук, М.М. Липина, А.В. Гаркави, И.А. Вязанкин, Д.А. Погосян, Е.Б. Калинин, Б.М. Калинин, Т.Р. Кудрачев, Э.Э. Мурдалов, А.Р. Дрогин, Н.О. Белов, Н.Р. Ровнягина, Г.С. Будылин // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2023. – № 1 (51). – С. 73–81.
27. Оценка остеointegrации коллагеновой мембраны при реконструкции связочного аппарата коленного сустава (экспериментальное исследование) / Э.Э. Мурдалов, А.В. Лычагин, П.С. Тимашев, М.М. Липина, Е.Б. Калинин, А.П. Купряков, Д.С. Бобров, Д.А. Погосян, А.Б. Шехтер, А.Л. Файзулин, Н.Б. Сережникова, А.А. Антошин, И.В. Ермилов, А.А. Подлесная, Т.Р. Кудрачев, А.М. Магданов, С.Е. Зотов, М.И. Шкредина, А.А. Шубкина // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2023. – № 2 (52). – С. 32–40.
28. Перспективы создания искусственных тканей и органов человека на основе метода трехмерной биопечати / Д.В. Булгин, А.Л. Ковтун, И.В. Решетов, Е.Ю. Радомская // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25. – № 2. – С. 63–81.

29. Предикторы перехода рентгенологической нулевой стадии остеоартрита коленных суставов в первую стадию (на основании балльной комплексной системы оценки коленного сустава WORMS) / М.В. Макарова, М.Ю. Вальков, Л.Е. Валькова [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23. – № 1. – С. 33–44.
30. Применение аддитивных технологий 3D-печати в нейрохирургии, вертебрологии, травматологии и ортопедии / А.В. Яриков, Р.О. Горбатов, А.А. Денисов [и др.] // Клиническая практика. – 2021. – Т. 12. – № 1. – С. 90–104.
31. Применение аддитивных технологий при замещении огнестрельных дефектов костей конечностей / Д.В. Давыдов, Л.К. Брижань, А.А. Керимов [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2022. – Т. 17. – № 4. – С. 57–64.
32. Применение аддитивных технологий при эндопротезировании плечевого сустава / Е.Б. Калинин, А.М. Байрамкулов, Е.П. Тычина [и др.] // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2023. – № 3 (53). – С. 38–45.
33. Разработка тканеинженерных конструкций на основе смеси хитозана и поликапролактона для сосудистой хирургии / И.С. Захарова, А.М. Смирнова, М.К. Живень [и др.] // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11. – № 4. – С. 50–56.
34. Ранние результаты эндопротезирования тазобедренного сустава с применением индивидуальных аугментов при диспластическом коксартрозе / Я.А. Рукин, А.В. Лычагин, В.Ю. Мурылев [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2020. – Т. 26. – № 2. – С. 50–59.
35. Рыбалко, Д.Ю. Строение менисков коленного сустава человека и их фиксирующего аппарата в зрелом, пожилом и старческом возрастах: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.02 – Анатомия человека / Рыбалко Дмитрий Юрьевич; ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ». – Уфа, 2007. – 203 с.
36. Рябчиков, И.В. Оптимизация тактики консервативного лечения пациентов с повреждениями менисков коленного сустава / И.В. Рябчиков, Ф. Мохаммад // Современные проблемы науки и образования. – 2023. – № 6. – С. 153.

37. Собственный опыт применения поликапролактона при производстве скаффолда мениска коленного сустава / Т.Р. Кудрачев, А.В. Лычагин, М.М. Липина, Е.Б. Калинин, М.П. Елизаров, Ю.Р. Гончарук, Н.А. Аксенова, Д.И. Ларионов, М.И. Шкердина // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2023. – № 1 (51). – С. 18–24.
38. Современное состояние тканевой инженерии для восстановления хрящевой ткани / Е.Е. Бекетов, Е.В. Исаева, П.В. Шегай [и др.] // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. – № 2. – С. 12–20.
39. Современные возможности диагностики и лечения разрывов менисков коленного сустава / Т.Р. Кудрачев, К.М. Азаркин, Ю.Р. Гончарук, А.В. Лычагин, П.С. Тимашев, М.М. Липина, П.И. Петров, Г.М. Кавалерский // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2022. – № 4 (41). – С. 57–66.
40. Современные методы оперативного лечения пациентов с повреждениями менисков (обзор литературы) / Г.П. Котельников, К.Э. Газиев, Ю.Д. Ким, С.Д. Зуев-Ратников // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье. – 2023. – Т. 13. – № 3. – С. 64–71.
41. Сравнительный анализ эффективности артроскопии и комплексной терапии при лечении дегенеративных разрывов менисков у больных с остеоартрозом коленного сустава / М.С. Бессараб, Г.О. Краснов, А.М. Чарчян, С.Н. Хорошков // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2021. – Т. 5. – № 2. – С. 71–77.
42. Ультроструктура биodeградируемых имплантатов: изменения во времени / А.А. Ахпашев, Е.А. Джамбинова, А.С. Канаев, Д.С. Агзамов // Клиническая практика. – 2015. – № 1 (21). – С. 17–24.
43. Филиппов, О.П. Диагностика и лечение повреждений менисков при травме коленного сустава: дис. ... док. мед. наук: 14.00.22 – Травматология и ортопедия / Филиппов Олег Петрович; Научно-исследовательский институт скорой помощи. – Москва, 2004. – 353 с.
44. Ходыревская, Ю.И. Плазменная модификация полимерных материалов с целью изменения их поверхностных свойств / Ю.И. Ходыревская // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2014. – № 2 – С. 66–67.

45. Хонинов, Б.В. Возможности применения биodeградируемых материалов в травматологии и ортопедии (обзор литературы) / Б.В. Хонинов, О.Н. Сергунин, П.А. Скорогляднов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1 – С. 20–24.
46. Хурамшина, А.Р. Анатомия и биомеханика менисков: клинические аспекты / А.Р. Хурамшина, Д.Ю. Рыбалко // Современные проблемы науки и образования. – 2023. – № 4. – С.152.
47. Экспериментальное обоснование регенеративного потенциала коллагеновых мембран для реконструкции полнослойных дефектов гиалинового хряща / Г.Д. Лазишвили, К.А. Егиазарян, Д.В. Никишин [и др.] // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2021. – № 4. – С. 53–59
48. Электроспиннинг для дизайна материалов медицинского назначения / Е.И. Кретов, Е.Н. Заполоцкий, А.Р. Таркова [и др.]// Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19. – № 2. – С. 153–162.
49. Эффективность применения коллагеновых мембран для реконструкции полнослойных дефектов гиалинового хряща в эксперименте / Г.Д. Лазишвили, К.А. Егиазарян, Д.В. Никишин [и др.] // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2021. – № 4 (46). – С. 17–23.
50. 3D bioprinting of a biomimetic meniscal scaffold for application in tissue engineering / Z. Jian, T. Zhuang, T. Qinyu [et al.] // Bioactive Materials. – 2021. – Vol. 6. – № 6. – P. 1711–1726.
51. 3D printed biofunctionalized scaffolds for microfracture repair of cartilage defects / T. Guo, M. Noshin, H.B. Baker [et al.] // Biomaterials. – 2018. – Vol. 185 – P. 219–231.
52. 3D-printed cell-free PCL–MECM scaffold with biomimetic micro-structure and micro-environment to enhance in situ meniscus regeneration / W. Guo, M. Chen, Z. Wang [et al.] // Bioactive Materials. – 2021. – Vol. 6. – № 10. – P. 3620–3633.
53. 3D-Printed Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold Augmented With Mesenchymal Stem Cells for Total Meniscal Substitution: A 12- and 24-Week Animal Study in a Rabbit Model / Z.Z. Zhang, S.J. Wang, J.Y. Zhang [et al.] // The American journal of sports medicine. – 2017. – Vol.45. – № 7. – P. 1497–1511.

54. A 3D printed PCL/hydrogel construct with zone-specific biochemical composition mimicking that of the meniscus / G. Bahcecioglu, N. Hasirci, B. Bilgen, V. Hasirci // *Biofabrication*. – 2019. – Vol. 11. – № 2. – Art. 025002.
55. A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: selective laser sintering and inkjet 3D printing / S.F. Shirazi, S. Gharehkhani, M. Mehrali [et al.] // *Science and Technology of Advanced Materials*. – 2015. – Vol. 16. – № 3. – Art. 033502.
56. A review on the recent applications of synthetic biopolymers in 3D printing for biomedical applications / S. Shiva, R.G. Asuwin Prabu, G. Bajaj [et al.] // *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. – 2023. – Vol. 34. – № 12. – Art. 62.
57. Abbadessa, A. Engineering Anisotropic Meniscus: Zonal Functionality and Spatiotemporal Drug Delivery / A. Abbadessa, J. Crecente-Campo, M.J. Alonso // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2021. – Vol. 27. – № 2. – P. 133–154.
58. Addressing meniscal deficiency part 2: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses on meniscal scaffold-based approaches / K.A. Wu, A.D. Therien, L.V. Kiwinda [et al.] // *Journal of Experimental Orthopaedics*. – 2024. – Vol. 11. – № 3. – Art. e12108.
59. Advanced Biomaterials and Processing Methods for Liver Regeneration: State-of-the-Art and Future Trends / A. da Silva Morais, S. Vieira, X. Zhao [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – Art. e1901435.
60. Advances and Prospects in Tissue-Engineered Meniscal Scaffolds for Meniscus Regeneration / W. Guo, S. Liu, Y. Zhu [et al.] // *Stem Cells International*. – 2015. – Vol. 2015. – Art. 517520.
61. Advances in electrospun scaffolds for meniscus tissue engineering and regeneration / X. Wang, Y. Ding, H. Li [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. – 2022. – Vol. 110. – № 4. – P. 923–949.
62. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review / E.M. Ahmed // *Journal of Advanced Research*. – 2015. – Vol. 6. – № 2. – P. 105–121.
63. An Up-to-Date Review of the Meniscus Literature: A Systematic Summary of Systematic Reviews and Meta-analyses / J.B. Smoak, J.R. Matthews, A.V. Vinod [et al.]

// Orthopaedic Journal of Sports Medicine. – 2020. – Vol. 8. – № 9. – Art. 2325967120950306.

64. Anatomical and biomechanical characteristics of human meniscomfemoral ligaments / T. Kusayama, C.D. Harner, G.J. Carlin [et al.] // Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA. – 1994. – Vol. 2. – № 4. – P. 234–237.

65. Anatomical meniscus construct with zone specific biochemical composition and structural organization / G. Bahcecioglu, B. Bilgen, N. Hasirci, V. Hasirci // Biomaterials. – 2019. – Vol. 218. – Art. 119361.

66. Application of additive manufacturing in the biomedical field- A review / A. Harding, A. Pramanik, A.K. Basak [et al.] // Annals of 3D Printed Medicine. – 2023. – Vol. 10. – Art. 100110.

67. Arnoczky, S.P. Microvasculature of the human meniscus / S.P. Arnoczky, R.F. Warren // The American Journal of Sports Medicine. – 1982. – Vol. 10. – № 2. – P. 90–95.

68. Augmentation Techniques for Meniscus Repair / L. Ghazi Zadeh, A. Chevrier, J. Farr [et al.] // The Journal of Knee Surgery. – 2018. – Vol. 31. – № 1. – P. 99–116.

69. Bahcecioglu, G. Cell behavior on the alginate-coated PLLA/PLGA scaffolds / G. Bahcecioglu, N. Hasirci, V. Hasirci // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 124. – P. 444–450.

70. Betancourt, J.P. Leukocyte-poor platelet-rich plasma to treat degenerative meniscal tear: A case report / J.P. Betancourt, W.D. Murrell // Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma. – 2016. – Vol. 7. – № Suppl 1. – P. 106–109.

71. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine / L. Moroni, J.A. Burdick, C. Highley [et al.] // Nature Reviews Materials. – 2018. – Vol. 3 – № 5. – P. 21–37.

72. Biosynthetic scaffolds for partial meniscal loss: A systematic review from animal models to clinical practice / F. Veronesi, B. Di Matteo, N.D. Vitale [et al.] // Bioactive Materials. – 2021. – Vol. 6. – № 11. – P. 3782–3800.

73. Cell-Based Strategies for Meniscus Tissue Engineering / W Niu, W Guo, S Han [et al.] // Stem cells international. – 2016. – Vol. 2016. – Art. 4717184

74. Chae, S. Biomaterial-based 3D bioprinting strategy for orthopedic tissue engineering / S. Chae, D.W. Cho // *Acta Biomaterialia*. – 2023. – Vol. 156. – P. 4–20.
75. Chan, B.P. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations / B.P. Chan, K.W. Leong // *European Spine Journal*. – 2008. – Vol. 17. – № Suppl 4. – P. 467–479.
76. Changes in knee joint load indices from before to 12 months after arthroscopic partial meniscectomy: a prospective cohort study / J.B. Thorlund, A. Holsgaard-Larsen, M.W. Creaby [et al.] // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2016. – Vol. 24. – № 7. – P. 1153–1159.
77. Classification and Surgical Repair of Ramp Lesions of the Medial Meniscus / M. Thaunat, J.M. Fayard, T.M. Guimaraes [et al.] // *Arthroscopy Techniques*. – 2016. – Vol. 5. – № 4. – P. e871–e875.
78. Comparative Study of Collagen versus Synthetic-Based Meniscal Scaffolds in Treating Meniscal Deficiency in Young Active Population / E. Bulgheroni, A. Grassi, M. Campagnolo [et al.] // *Cartilage*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 29–38.
79. Comparison of inside-out and all-inside techniques for the repair of isolated meniscal tears: a systematic review / J.A. Grant, J. Wilde, B.S. Miller, A. Bedi // *The American Journal of Sports Medicine*. – 2012. – Vol. 40. – № 2. – P. 459–468.
80. Continued sustained insulin-releasing PLGA nanoparticles modified 3D-Printed PCL composite scaffolds for osteochondral repair / P. Wei, Y. Xu, H. Zhang, L. Wang // *Chemical Engineering Journal*. – 2021. – Vol. 422. – № 11. – Art. 130051.
81. Cooper, D.E. Meniscal repair / D.E. Cooper, S.P. Arnoczky, R.F. Warren // *Clinics in Sports Medicine*. – 1991. – Vol. 10. – № 3. – P. 529–548.
82. Current concepts in the techniques, indications and outcomes of meniscal repairs / M. Karia, Y. Ghaly, N. Al-Hadithy [et al.] // *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology: Orthopedie Traumatologie*. – 2019. – Vol. 29. – № 3. – P. 509–520.
83. Degenerative Joint Disease After Meniscectomy / M.D. Bedrin, K. Kartalias, B.G. Yow, J.F. Dickens // *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. – 2021. – Vol. 29. – № 3. – P. e44–e50.

84. Degenerative meniscus: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options / R. Howell, N.S. Kumar, N. Patel, J. Tom // *World Journal of Orthopedics*. – 2014. – Vol. 5. – № 5. – P. 597–602.
85. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering / V. Raeisdasteh Hokmabad, S. Davaran, A. Ramazani, R. Salehi // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2017. – Vol. 28. – № 16. – P. 1797–1825.
86. Design of a novel electrospinning setup for the fabrication of biomimetic scaffolds for meniscus tissue engineering applications / T.D. Stocco, B.V.M. Rodrigues, F.R. Marciano, A.O. Lobo // *Materials Letters*. – 2017. – Vol. 196. – P. 221–224.
87. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration / P. Chen, L. Zheng, Y. Wang [et al.] // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9. – № 9. – P. 2439–2459.
88. Dhollander, A. Treatment of Painful, Irreparable Partial Meniscal Defects With a Polyurethane Scaffold: Midterm Clinical Outcomes and Survival Analysis / A. Dhollander, P. Verdonk, R. Verdonk // *The American Journal of Sports Medicine*. – 2016. – Vol. 44. – № 10. – P. 2615–2621.
89. Effect of exercise and gait retraining on knee adduction moment in people with knee osteoarthritis / N. Khalaj, N.A. Abu Osman, A.H. Mokhtar [et al.] // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H: Journal of Engineering in Medicine*. – 2014. – Vol. 228. – № 2. – P. 190–199.
90. Efficacy of meniscus suture absorbability on meniscus healing success rate via second-look arthroscopy after meniscal repair: a systematic review and meta-analysis / W. Wei, Y. Zhang, R. Li [et al.] // *BMC musculoskeletal disorders*. – 2023. – Vol. 24. – № 1. – Art. 717.
91. Fabrication and assessment of a novel hybrid scaffold consisted of polyurethane-gellan gum-hyaluronic acid-glucosamine for meniscus tissue engineering / F. Amiri, M. Babaei, N. Jamshidi [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 203. – P. 610–622.

92. Feeley, B.T. Biomechanics and Clinical Outcomes of Partial Meniscectomy / B.T. Feeley, B.C. Lau // The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. – 2018. – Vol. 26. – № 24. – P. 853–863.
93. Fithian, D.C. Material properties and structure-function relationships in the menisci / D.C. Fithian, M.A. Kelly, V.C. Mow // Clinical Orthopaedics and Related Research. – 1990. – № 252. – P. 19–31.
94. Fox A.J. The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function / A.J. Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo // Sports Health. – 2012. – Vol. 4. – № 4. – P. 340–351.
95. Gee, S.M. Meniscus Anatomy and Basic Science / S.M. Gee, M. Posner // Sports Medicine and Arthroscopy Review. – 2021. – Vol. 29. – № 3. – P. e18–e23.
96. Gersoff, W.K. Meniscal restoration: scaffolds, transplantation, and implants / W.K. Gersoff // Journal of Cartilage & Joint Preservation. – 2023. – Vol. 3. – № 1. – Art. 100108.
97. Hampshire, V. Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring / V. Hampshire, S. Robertson // Lab animal. – 2015. – Vol. 44. – № 7. – P. 259–260.
98. Herwig, J. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration / J. Herwig, E. Egner, E. Buddecke // Annals of the Rheumatic Diseases. – 1984. – Vol. 43. – № 4. – P. 635–640.
99. Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report / S.A. Rodeo, A. Seneviratne, K. Suzuki [et al.] // The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume. – 2000. – Vol. 82. – № 8. – P. 1071–1082.
100. Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering / K. Nakata, K. Shino, M. Hamada [et al.] // Clinical Orthopaedics and Related Research. – 2001. – № 391, Suppl. – P. S208–218.
101. Hydrogels of agarose, and methacrylated gelatin and hyaluronic acid are more supportive for in vitro meniscus regeneration than three dimensional printed polycaprolactone scaffolds / G. Bahcecioglu, N. Hasirci, B. Bilgen, V. Hasirci // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 122. – P. 1152–1162.

102. ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. – URL: https://cartilage.org/wp-content/uploads/2024/07/ICRS_evaluation1-1.pdf – Текст: электронный. (Дата обращения: 12.03. 2025)
103. In vivo resorption of a biodegradable polyurethane foam, based on 1,4-butanediisocyanate: a three-year subcutaneous implantation study / B. van Minnen, M.B.M. van Leeuwen, G. Kors [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. – 2008. – Vol. 85. – № 4. – P. 972–982.
104. Integrated bioactive scaffold with aptamer-targeted stem cell recruitment and growth factor-induced pro-differentiation effects for anisotropic meniscal regeneration / H. Li, T. Zhao, F. Cao [et al.] // Bioengineering & Translational Medicine. – 2022. – Vol. 7. – № 3. – Art. e10302.
105. Interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 and integrative meniscal repair: influences on meniscal cell proliferation and migration / K.M. Riera, N.E. Rothfus, R.E. Wilusz [et al.] // Arthritis Research & Therapy. – 2011. – Vol. 13. – № 6. – Art. R187.
106. International Meniscus Reconstruction Experts Forum (IMREF) 2015 Consensus Statement on the Practice of Meniscal Allograft Transplantation / A. Getgood, R.F. LaPrade, P. Verdonk [et al.] // The American Journal of Sports Medicine. – 2017. – Vol. 45. – № 5. – P. 1195–1205.
107. Interobserver Reliability of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS) Classification of Meniscal Tears / A.F. Anderson, J.J. Irrgang, W. Dunn [et al.] // The American Journal of Sports Medicine. – 2011. – Vol. 39. – № 5. – P. 926–932.
108. Intraspecies and interspecies comparison of the compressive properties of the medial meniscus / M.A. Sweigart, C.F. Zhu, D.M. Burt [et al.] // Annals of Biomedical Engineering. – 2004. – Vol. 32. – № 11. – P. 1569–1579.
109. ISAKOS classification of meniscal tears—illustration on 2D and 3D isotropic spin echo MR imaging / V. Wadhwa, H. Omar, K. Coyner [et al.] // European Journal of Radiology. – 2016. – Vol. 85. – № 1. – P. 15–24.

110. Kohli, S. Failure rates and clinical outcomes of synthetic meniscal implants following partial meniscectomy: a systematic review / S. Kohli, J. Schwenck, I. Barlow // *Knee Surgery & Related Research*. – 2022. – Vol. 34. – № 1. – Art. 27.
111. Kurosawa, H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci / H. Kurosawa, T. Fukubayashi, H. Nakajima // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 1980. – № 149. – P. 283–290.
112. Leucocyte and Platelet-rich Fibrin: a carrier of autologous multipotent cells for regenerative medicine / R. Di Liddo, T. Bertalot, A. Borean [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2018. – Vol. 22. – № 3. – P. 1840–1854.
113. Lombardo, M.D.M. Biomaterials and Meniscal Lesions: Current Concepts and Future Perspective / M.D.M. Lombardo, L. Mangiavini, G.M. Peretti // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 11. – Art. 1886.
114. Long-term Evaluation of Meniscal Tissue Formation in 3-dimensional-Printed Scaffolds With Sequential Release of Connective Tissue Growth Factor and TGF- β 3 in an Ovine Model / Y. Nakagawa, L.A. Fortier, J.J. Mao [et al.] // *The American journal of sports medicine*. – 2019. – Vol. 47. – № 11. – P. 2596–2607.
115. Long-term rates of knee arthroplasty in a cohort of 834 393 patients with a history of arthroscopic partial meniscectomy / S.G.F. Abram, A. Judge, D.J. Beard [et al.] // *The Bone & Joint Journal*. – 2019. – Vol. 101-B. – № 9. – P. 1071–1080.
116. Long-Term Survival Analysis and Outcomes of Meniscal Allograft Transplantation With Minimum 10-Year Follow-Up: A Systematic Review / J.V. Novaretti, N.K. Patel, J. Lian [et al.] // *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. – 2019. – Vol. 35. – № 2. – P. 659–667.
117. Macroporous scaffold surface modified with biological macromolecules and piroxicam-loaded gelatin nanofibers toward meniscus cartilage repair / Z. Abpeikar, M. Javdani, S.A. Mirzaei [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 183. – P. 1327–1345.

118. Makris, E.A. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration / E.A. Makris, P. Hadidi, K.A. Athanasiou // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 30. – P. 7411–7431.
119. McDermott, I. Meniscal tears, repairs and replacement: their relevance to osteoarthritis of the knee / I. McDermott // *British Journal of Sports Medicine*. – 2011. – Vol. 45. – № 4. – P. 292–297.
120. Meniscal allograft transplantation: a review of the current literature / T.B. Crook, A. Ardolino, L.A. Williams., I.W. Barlow // *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. – 2009. – Vol. 91. – № 5. – P. 361–365.
121. Meniscal Allograft Transplants / T.M. Southworth, N.B. Naveen, T.M. Tauro [et al.] // *Clinics in Sports Medicine*. – 2020. – Vol. 39. – № 1. – P. 93–123.
122. Meniscal Regenerative Scaffolds Based on Biopolymers and Polymers: Recent Status and Applications / H. Li, P. Li, Z. Yang [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – Art. 661802.
123. Meniscal root tears: a classification system based on tear morphology / C.M. LaPrade, E.W. James, T.R. Cram [et al.] // *The American Journal of Sports Medicine*. – 2015. – Vol. 43. – № 2. – P. 363–369.
124. Meniscal root tears: Solving the silent epidemic / R. LaPrade, E. Floyd, G. Carlson [et al.] // *Journal of Arthroscopic Surgery and Sports Medicine*. – 2021. – Vol. 2. – № 1. – P. 47–57.
125. Meniscal scaffolds: results and indications. A systematic literature review / G. Filardo, L. Andriolo, E. Kon [et al.] // *International Orthopaedics*. – 2015. – Vol. 39. – № 1. – P. 35–46.
126. Meniscal Tissue Engineering Using Aligned Collagen Fibrous Scaffolds: Comparison of Different Human Cell Sources / J. Baek, S. Sovani, W. Choi [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2018. – Vol. 24. – № 1–2. – P. 81–93.
127. Meniscectomy is associated with a higher rate of osteoarthritis compared to meniscal repair following acute tears: a meta-analysis / F. Migliorini, L. Schäfer, A. Bell [et al.] // *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. – 2023. – Vol. 31. – № 12. – P. 5485–5495.

128. Meniscus Tear: Pathology, Incidence, and Management / E. Luvsannyam, M.S. Jain, A.R. Leitaó [et al.] // *Cureus*. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – Art. e25121.
129. Meniscus-Derived Matrix Scaffolds Promote the Integrative Repair of Meniscal Defects / J.C. Ruprecht, T.D. Waanders, C.R. Rowland [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – Ar. 8719.
130. Methods for determining the molecular composition of knee joint structures in osteoarthritis: collagen, proteoglycans and water content: a systematic review / B. Raikov, M. Lipina, K. Azarkin, Y. Goncharuk, I. Vyazankin, E. Kalinsky, T. Kudrachev, E. Murdalov, E. Nagornov, G. Budylin, E. Shirshin, N. Rovnyagina, V. Cherepanov, A. Kurpyakov, V. Telpukhov, N. Belov, D. Pogosyan, G. Kavalerskiy, A. Gritsyuk, A. Garkavi, A. Lychagin // *Collagen and Leather*. – 2024. – Vol. 6. – Art. 30.
131. Modelling and optimization of NaOH-etched 3-D printed PCL for enhanced cellular attachment and growth with minimal loss of mechanical strength / D. Gupta, A.K. Singh, N. Kar [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – Vol. 98. – P. 602–611.
132. Mulry, T.J. The Classification of Knee Meniscal Cartilage Tears / T.J. Mulry, L.F. McIntyre // *Operative Techniques in Sports Medicine*. – 2018. – Vol. 26. – № 4. – P. 228–232.
133. Myers, K.R. Meniscal scaffolds / K.R. Myers, N.A. Sgaglione, A.D. Goodwillie // *The Journal of Knee Surgery*. – 2014. – Vol. 27. – № 6. – P. 435–442.
134. National Trends of Meniscectomy and Meniscus Repair in Korea / K.S. Chung, J.K. Ha, Y.S. Kim [et al.] // *Journal of Korean Medical Science*. – 2019. – Vol. 34. – № 32. – Art. e206.
135. Nau, T. Regeneration of the anterior cruciate ligament: Current strategies in tissue engineering / T. Nau, A. Teuschl // *World Journal of Orthopedics*. – 2015. – Vol. 6. – № 1 – P. 127–136.
136. No differences in clinical outcome between CMI and Actifit meniscal scaffolds: a systematic review and meta-analysis / D. Reale, D. Previtali, L. Andriolo [et al.] // *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. – 2022. – Vol. 30. – № 1. – P. 328–348.

137. Outcome after partial medial meniscus substitution with the collagen meniscal implant at a minimum of 10 years' follow-up / J.C. Monllau, P.E. Gelber, F. Abat [et al.] // *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. – 2011. – Vol. 27. – № 7. – P. 933–943.
138. Outcomes, Complications, and Reoperations After Meniscal Allograft Transplantation / S. Vasta, B. Zampogna, T.D. Hartog [et al.] // *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. – 2022. – Vol. 10. – № 3. – Art. 23259671221075310.
139. Pangborn, C.A. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds / C.A. Pangborn, K.A. Athanasiou // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2005. – Vol. 23. – № 5. – P. 1184–1190.
140. Partial Meniscus Replacement with a Collagen-Hyaluronan Infused Three-Dimensional Printed Polymeric Scaffold / S.A. Ghodbane, A. Brzezinski, J.M. Patel [et al.] // *Tissue Engineering. Part A*. – 2019. – Vol. 25. – № 5–6. – P. 379–389.
141. PCL-MECM-Based Hydrogel Hybrid Scaffolds and Meniscal Fibrochondrocytes Promote Whole Meniscus Regeneration in a Rabbit Meniscectomy Model / M. Chen, Z. Feng, W. Guo [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2019. – Vol. 11. – № 44. – P. 41626–41639.
142. Percutaneous injections of Platelet rich plasma for treatment of intrasubstance meniscal lesions / F. Blanke, P. Vavken, M. Haenle [et al.] // *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. – 2015. – Vol. 5. – № 3. – P. 162–166.
143. Petersen, W. Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci / W. Petersen, B. Tillmann // *Anatomy and Embryology*. – 1998. – Vol. 197. – № 4. – P. 317–324.
144. Plasma treatment effects on bulk properties of polycaprolactone nanofibrous mats fabricated by uncommon AC electrospinning: A comparative study / M. Sivan, D. Madheswaran, M. Asadian [et al.] // *Surface and Coatings Technology*. – 2020. – Vol. 399. – Art. 126203.

145. Platelet-rich plasma in meniscal repair: does augmentation improve surgical outcomes? / J.W. Griffin, M.M. Hadeed, B.C. Werner [et al.] // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2015. – Vol. 473. – № 5. – P. 1665–1672.
146. Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review / E.H. Backes, S.V. Harb, C.A.G. Beatrice [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. – 2022. – Vol. 110. – № 6. – P. 1479–1503.
147. Polyurethane Meniscal Scaffold for the Treatment of Partial Meniscal Deficiency: 5-Year Follow-up Outcomes: A European Multicentric Study / C. Toanen, A. Dhollander, P. Bulgheroni [et al.] // *The American Journal of Sports Medicine*. – 2020. – Vol. 48. – № 6. – P. 1347–1355.
148. Polyurethane meniscal scaffolds lead to better clinical outcomes but worse articular cartilage status and greater absolute meniscal extrusion / Y.S. Shin, H.N. Lee, H.B. Sim [et al.] // *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. – 2018. – Vol. 26. – № 8. – P. 2227–2238.
149. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering / I. Matai, G. Kaur, A. Seyedsalehi [et al.] // *Biomaterials*. – 2020. – Vol. 226. – Art. 119536.
150. Recent advances in 3D bioprinting of musculoskeletal tissues / T. Potyondy, J.A. Uquillas, P.J. Tebon [et al.] // *Biofabrication*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – Art. 10.1088/1758-5090/abc8de.
151. Recent advances in tendon tissue engineering strategy / C. Ning, P. Li, C. Gao [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 11. – Art. 1115312.
152. Renström, P. Anatomy and Biomechanics of the Menisci / P. Renström, R.J. Johnson // *Clinics in Sports Medicine*. – 1990. – Vol. 9. – № 3. – P. 523–538.
153. Role of scaffold mean pore size in meniscus regeneration / Z.Z. Zhang, D. Jiang, J.X. Ding [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2016. – Vol. 43. – P. 314–326.
154. Sayegh, E.T. Classifications in Brief: The International Society of Arthroscopy, Knee Surgery, and Orthopaedic Sports Medicine Classification of Meniscal Tears /

- E.T. Sayegh, E. Matzkin // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2022. – Vol. 480. – № 1. – P. 39–44.
155. Schwer, J. The biomechanical properties of human menisci: A systematic review / J. Schwer, A. Ignatius, A.M. Seitz // *Acta Biomaterialia*. – 2024. – Vol. 175. – P. 1–26.
156. Seedhom, B.B. Transmission of the Load in the Knee Joint with Special Reference to the Role of the Menisci: Part II: Experimental Results, Discussion and Conclusions / B.B. Seedhom, D.J. Hargreaves // *Engineering in Medicine*. – 1979. – Vol. 8. – № 4. – P. 220–228.
157. Short-Term but Not Long-Term Knee Symptoms and Functional Improvements of Tissue Engineering Strategy for Meniscus Defects: A Systematic Review of Clinical Studies / Y. Bian, X. Cai, H. Wang [et al.] // *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. – 2024. – Vol. 40. – № 3. – P. 983–995.
158. Staerke, C. The extent of laceration of circumferential fibers with suture repair of the knee meniscus. Winner of the AGA DonJoy award 2006 / C. Staerke, S. Kopf, R. Becker // *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. – 2008. – Vol. 128. – № 5. – P. 525–530.
159. Structure-function relationships of human meniscus / E.K. Danso, J.M.T. Oinas, S. Saarakkala [et al.] // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2017. – Vol. 67. – P. 51–60.
160. Study on the preparation of polycaprolactone/type I collagen tissue engineered meniscus scaffold by three-dimensional printing and its physiochemical properties / S. Shen, M. Chen, S. Gao [et al.] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. – 2018. – Vol. 32. – № 9. – P. 1205–1210.
161. Surgical treatment of complex meniscus tear and disease: state of the art / N. Ozeki, R. Seil, A.J. Krych, H. Koga // *Journal of ISAKOS: joint disorders & orthopaedic sports medicine*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 35–45.
162. Taylor, S.A. Augmentation techniques for isolated meniscal tears / S.A. Taylor, S.A. Rodeo // *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 95–101.

163. The application of electrospinning used in meniscus tissue engineering / M. Chen, S. Gao, P. Wang [et al.] // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2018. – Vol. 29. – № 5. – P. 461–475.
164. The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study / G.A. Paletta Jr, T. Manning, E. Snell [et al.] // The American Journal of Sports Medicine. – 1997. – Vol. 25. – № 5. – P. 692–698.
165. The effect of IGF-I on anatomically shaped tissue-engineered menisci / J.L. Puetzer, B.N. Brown, J.J. Ballyns, L.J. Bonassar // Tissue Engineering. Part A. – 2013. – Vol. 19. – № 11–12. – P. 1443–1450.
166. The first-generation anatomical medial meniscus prosthesis led to unsatisfactory results: a first-in-human study / T.G. van Tienen, B. van Minnen, K.C. Defoort [et al.] // Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA. – 2023. – Vol. 31. – № 6. – P. 2526–2533.
167. The human meniscus: a review of anatomy, function, injury, and advances in treatment / A.J. Fox, F. Wanivenhaus, A.J. Burge [et al.] // Clinical Anatomy (New York, N.Y.). – 2015. – Vol. 28. – № 2. – P. 269–287.
168. The knee meniscus: management of traumatic tears and degenerative lesions / P. Beaufils, R. Becker, S. Kopf [et al.] // EFORT Open Reviews. – 2017. – Vol. 2. – № 5. – P. 195–203.
169. The vascular and nerve supply of the human meniscus / B. Day, W.G. Mackenzie, S.S. Shim, G. Leung // Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association. – 1985. – Vol. 1. – № 1. – P. 58–62.
170. Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions / R. Verdonk, P. Verdonk, W. Huysse [et al.] // The American journal of sports medicine. – 2011. – Vol. 39. – № 4. – P. 774–782.
171. Tissue-Engineered Total Meniscus Replacement With a Fiber-Reinforced Scaffold in a 2-Year Ovine Model / J.M. Patel, S.A. Ghodbane, A. Brzezinski [et al.] // The American Journal of Sports Medicine. – 2018. – Vol. 46. – № 8. – P. 1844–1856.

172. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells / R. Kuroda, K. Ishida, T. Matsumoto [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2007. – Vol. 15. – № 2. – P. 226–231.
173. Treatment of Knee Meniscus Pathology: Rehabilitation, Surgery, and Orthobiologics / P.S. Chirichella, S. Jow, S. Iacono [et al.] // PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation. – 2019. – Vol. 11. – № 3. – P. 292–308.
174. Treatment of meniscal tears: An evidence based approach / S.C. Mordecai, N. Al-Hadithy, H.E. Ware, C.M. Gupte // World Journal of Orthopedics. – 2014. – Vol. 5. – № 3. – P. 233–241.
175. Trends in isolated meniscus repair and meniscectomy in Japan, 2011-2016 / H. Katano, H. Koga, N. Ozeki [et al.] // Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association. – 2018. – Vol. 23. – № 4. – P. 676–681.
176. Trends in meniscus repair and meniscectomy in the United States, 2005-2011 / G.D. Abrams, R.M. Frank, A.K. Gupta [et al.] // The American Journal of Sports Medicine. – 2013. – Vol. 41. – № 10. – P. 2333–2339.
177. Two-Year Follow-up Study on Clinical and Radiological Outcomes of Polyurethane Meniscal Scaffolds / T. De Coninck, W. Huysse, L. Willemot [et al.] // The American Journal of Sports Medicine. – 2013. – Vol. 41. – № 1. – P. 64–72.
178. Twomey-Kozak, J. Meniscus repair and regeneration: A systematic review from a basic and translational science perspective / J. Twomey-Kozak, C. Jayasuriya // Clinics in sports medicine. – 2020. – Vol. 39. – № 1. – P. 125–163.
179. van Minnen, B.S. The Current State of Meniscus Replacements / B.S. van Minnen, T.G. van Tienen // Current Reviews in Musculoskeletal Medicine. – 2024. – Vol. 17. – № 8. – P. 293–302.
180. Vasiliadis, A.V. Three-Dimensional-Printed Scaffolds for Meniscus Tissue Engineering: Opportunity for the Future in the Orthopaedic World / A.V. Vasiliadis, N. Koukoulas, K. Katakalo // Journal of Functional Biomaterials. – 2021. – Vol. 12. – № 4. – Art. 69.
181. What is the best way to fix a polyurethane meniscal scaffold? A biomechanical evaluation of different fixation modes / F. Hardeman, K. Corten, M. Mylle [et al.] // Knee

surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA. – 2015. – Vol. 23. – № 1. – P. 59–64.

182. Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis / C.G. Peterfy, A. Guermazi, S. Zaim [et al.] // Osteoarthritis and cartilage. – 2004. – Vol. 12. – № 3. – P. 177–190.

183. Wojtys, E.M. Meniscus structure and function / E.M. Wojtys, D.B. Chan // Instructional Course Lectures. – 2005. – Vol. 54. – P. 323–330.

184. Worhacz, K.M. Meniscal Allograft Transplantation: Does Surgical Technique Influence Clinical Outcomes? / K.M. Worhacz, T.R. Carter // Current Reviews in Musculoskeletal Medicine. – 2023. – Vol. 16. – № 5. – P. 163–172.

185. Xu, C. A meta-analysis comparing meniscal repair with meniscectomy in the treatment of meniscal tears: the more meniscus, the better outcome? / C. Xu, J. Zhao // Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA. – 2015. – Vol. 23. – № 1. – P. 164–170.

186. Yow, B.G. Meniscal Allograft Transplantation / B.G. Yow, M. Donohue, D.J. Tennent // Sports Medicine and Arthroscopy Review. – 2021. – Vol. 29. – № 3. – P. 168–172.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Шкала гримас кролика

Шкала гримас кролика оценивается по 5 пунктам: сужение орбиты глаз, сглаживание щек, изменение формы носа, положение усов и положение ушей. Каждый показатель оценивается по степеням – отсутствие признака (0 баллов), признак умеренной выраженности (1 балл) и сильной выраженности признак (2 балла) (Рисунок А.1). Как правило, более высокий общий балл по шкале гримас кролика указывает на большую степень боли и дискомфорта.



Рисунок А.1 – Шкала гримас кролика

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Модифицированная шкала оценки опорно-двигательного аппарата для кроликов после ортопедической операции (Basso, Beattie and Bresnahan Scale – Scale BBB)

Таблица Б.1 – Критерии оценки по шкале BBB

0	Отсутствие заметных движений задних конечностей.
1	Незначительные (ограниченные) движения в одном или двух суставах, обычно тазобедренного сустава и/или коленного сустава.
2	Значительное движение в одном суставе или значительное движение в одном суставе и незначительное движение в другом.
3	Значительное движение в двух суставах.
4	Незначительные движения во всех трех суставах задней конечности.
5	Незначительное движение в двух суставах и интенсивное движение в третьем суставе.
6	Значительные движения в двух суставах и незначительные в третьем суставе.
7	Значительные движения в трех суставах задних конечностей.
8	Подметание без опоры на задние конечности всем весом или подошвенная опора лапы без опоры всем весом тела.
9	Подошвенная опора лапы с опорой всем весом тела только в покое (т.е. в статическом положении) или случайные, частые или непоследовательные движения нижних конечностей с опорой на вес и без опоры на подошву.
10	Подошвенные движения с периодической опорой на вес и без координации движений передними конечностями.
11	Подошвенные передвижения с частой или постоянной опорой всем весом тела и без координации движений передними и задними конечностями.
12	Подошвенные движения с частичной опорой на задние конечности всем весом тела и без координации движений между передними и задними конечностями.
13	Шаги подошвенной части стопы с частичной опорой на задние конечности всем весом тела и частой координацией движений между передними и задними конечностями.
14	Шаги с подошвенной части стопы с постоянной опорой всем весом тела на заднюю конечность, постоянной координацией движений и преимущественно повернутым положением лапы (внутри или наружу) во время передвижения как в момент первоначального контакта с поверхностью, так и при частых подошвенных шагах, постоянной координации движений между передними и задними конечностями.
15	Последовательный шаг подошвенной части стопы, четкая координация движений; преимущественное положение лапы параллельно телу во время первоначального контакта.
16	Последовательный шаг подошвенной части стопы и координация движений передней и задних лап во время ходьбы; преобладающее положение лап параллельно телу в момент первоначального контакта и изогнуто в момент движения.
17	Последовательный шаг подошвенной части стопы и координация движений передней и задних лап во время ходьбы; преимущественное положение лап параллельно телу во время первоначального контакта и в момент движения.

Продолжение Таблицы Б.1

18	Последовательный шаг подошвенной части стопы и координация движений передней и задних лап во время ходьбы; преобладающее положение лап параллельно телу во время первоначального контакта и изогнуто во время движения. Животное частично стоит.
19	Последовательные шаги подошвенной части стопы и координация движений во время передвижения; преобладающее положение лап параллельно телу в момент контакта и во время движения, и иногда животное полностью выпрямляется.
20	Постоянное ступание подошвенной части стопы и координация движений передних и задних лап во время ходьбы; преобладающее положение лап параллельно телу в момент контакта и во время движения, и животное часто полностью выпрямляется.
21	Последовательный шаг подошвенной части стопы и скоординированная походка, согласованные движения; положение лап преимущественно параллельно телу на протяжении всего этапа поддержки; устойчивое положение в полном положении стоя.

Определения:

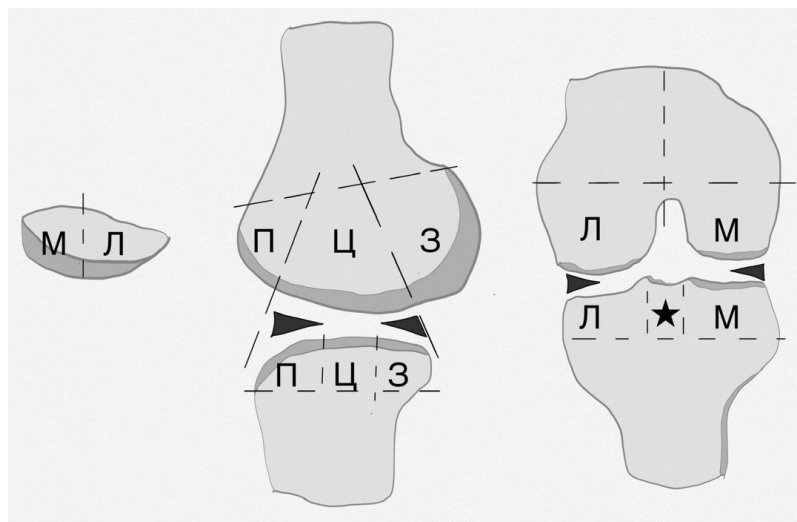
- незначительное движение: частичное движение в суставе менее чем на половину амплитуды движений в суставе;
- значительное движение: движение более чем на половину амплитуды движений в суставе;
- подметание: ритмичное движение лапами, при котором все три сустава разгибаются, затем полностью сгибаются и разгибаются снова; животное обычно лежит на боку, подошвенная поверхность лапы может касаться земли, а может и не касаться ее; не видно переноса веса тела на лапы;
- отсутствие опоры на конечность: нет сокращения мышц-разгибателей голени при постановке лапы на подошву; или нет приподнимания задней конечности;
- удержание веса: сокращение мышц-разгибателей голени при постановке лапы на подошву или поднятии задней конечности;
- подошвенное переступание: лапа находится в подошвенном контакте с опорой на вес тела, затем голень продвигается вперед, и подошвенный контакт с опорой для веса восстанавливается;
- тыльный шаг: момент цикла шага, в который вес переносится на тыльную поверхность лапы;

- координация движений: на каждый шаг передней лапы делается один шаг задней лапой, а движения задних лап чередуются;
- редкое: меньше или равно половине;
- частое: более половины, но не всегда; 51–94%;
- стабильное: почти всегда или нерегулярно: 95–100%;
- частичная опора на заднюю конечность: отрывание передней конечности от земли, но с трудом удержание туловища прямо более секунды;
- полная опора на заднюю конечность: отрывание передней конечности от земли с полной опорой на заднюю конечность.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score

Подсчет производили в 15 различных регионах коленного сустава (Рисунок В.1, Таблица В.1). Наибольшее количество баллов – 332.



Примечание: М – медиальный отдел, Л – латеральный отдел, П – передний отдел, Ц – центральный отдел, З – задний отдел, ★ – ненагружаемая область большеберцового плато

Рисунок В.1 – Оцениваемые по WORMS области коленного сустава

Таблица В.1 – Максимальное количество баллов, достижимое с помощью WORMS

	Медиальные отделы тибео- фemorального сустава	Латеральные отделы тибео- фemorального сустава	Патело- фemorальный сустав	Регион ★	Всего
Состояние хряща	30	30	24		84
Истончение субхондральной кости	15	15	12		42
Отек костного мозга	15	15	12	3	45
Периартикулярные кисты	15	15	12	3	45
Остеофиты	35	35	28		98
Мениски	6	6			12
Связочный аппарат					3
Синовит					3

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Оценка регенерации ткани мениска

(по К. Ishida et al., 2007)

Таблица Г.1 – Балльная система для оценки регенерации ткани мениска

Морфологические признаки		Оценка регенерации (баллы)
Интеграция регенерирующей ткани в окружающие ткани мениска	Отсутствует	0
	Частичная связь регенерирующей ткани с окружающими тканями мениска	1
	Двусторонняя связь регенерирующей ткани с окружающими тканями мениска	2
Наличие фиброхондроцитов в регенерирующей ткани	Отсутствуют	0
	Отдельные небольшие скопления хондроцитоподобных клеток в регенерирующей ткани	1
	Хондроцитоподобные клетки диффузно расположены в регенерирующей ткани	2
Окрашивание сафранином О регенерирующей ткани	Не окрашено	0
	Слабо окрашено	1
	Интенсивно окрашено	2
Общая сумма баллов		6

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Классификация Mankin

Таблица Д.1 – Гистологическую оценку деградации суставного хряща по классификации Mankin

Критерии	Балл	Гистологическая картина
Структура	0	Гладкая, неповрежденная поверхность
	1	Небольшие неровности поверхности
	2	Образование паннуса / фибрилляция поверхности
	3	Трещины в переходной зоне
	4	Трещины в радиальной зоне
	5	Трещины в кальцифицированной зоне
	6	Полная дезорганизация
Клетки	0	Равномерное распределение клеток
	1	Диффузная пролиферация клеток
	2	Кластеризация клеток
	3	Потеря клеток
Окрашивание толуидином	0	Равномерное окрашивание
	1	Незначительное изменение окраски
	2	Умеренное изменение окраски
	3	Сильное изменение окраски
	4	Полное исчезновение окраски
Целостность линии прилипания	0	Интактная линия
	1	Наличие васкуляризации