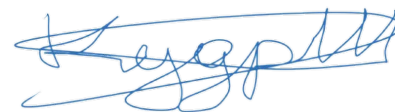


На правах рукописи



Кудрачев Тагир Радикович

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

3.1.8. Травматология и ортопедия

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Лычагин Алексей Владимирович

доктор химических наук, профессор

Тимашев Петр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Лазишвили Гурам Давидович – доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт хирургии, кафедра травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии, профессор кафедры

Затолокина Мария Алексеевна — доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» мая 2025г. в 12:00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.26 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 1

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент



Крупинев Герман Евгеньевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Дегенеративные изменения и острые разрывы мениска коленного сустава могут значительно ухудшить качество жизни пациента по причине боли и ограничения объема движений. Разрыв мениска является наиболее распространенным видом травмы колена, при этом частота травм мениска, приводящих к менискэктомии, составляет 61 на 100 000 населения в год [Abram S.G.F. et al. 2019, Mordecai S.C. et al. 2014]. Травматические повреждения менисков встречаются наиболее часто в активном трудоспособном возрасте и сопровождаются, по данным авторов, более половины всех случаев травмы коленного сустава.

Независимо от этиологии повреждений, нарушение целостности менисков способствует механическому повреждению хрящевой ткани и изменению биомеханики сустава, что обуславливает необходимость в дорогостоящем хирургическом лечении (хондропластика, эндопротезирование коленного сустава) [Сараев А.В. и др. 2020, Guo W. et al. 2021].

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 МРТ [Абдуразаков У.А. 2020, Альросан Б.а.с. и др. 2020, Хонинов Б.В. и др. 2014].

При острых разрывах мениска на первом этапе лечения возможно применение консервативных методов: физиотерапия, лечебная физкультура и симптоматическая медикаментозная терапия [Анатольевич А.А. и др. 2015]. Однако основой лечения остается хирургическая тактика.

Существует несколько вариантов хирургического лечения разрывов менисков коленного сустава. Они включают полную или частичную менискэктомию, шов мениска и его реконструкцию. В последнем случае для замены сегмента отсутствующего мениска используется аллогraft, протез или скаффолд мениска [Бекетов Е.Е. и др. 2019].

По данным исследований, даже частичная резекция мениска ведет к нарушению нормальной архитектоники структур коленного сустава и неправильному

перераспределению нагрузок, что приводит к прогрессированию остеоартроза [McDermott I. et al. 2011, Twomey-Kozak J. et al. 2020].

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 [Chan B.P. et al. 2008, Smoak J.V. et al. 2020].

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.

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.

Степень разработанности темы исследования

Долгие годы проблема регенерации мениска оставалась неразрешимой, однако в последнее время появились технологии, позволяющие рассчитывать на восстановление утраченной ткани мениска [Feeley B.T. et al. 2018]. 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 [van Tienen T.G. et al. 2023].

В клинической практике были допущены только два коммерческих менисковых скаффолда: скаффолд на коллагеновой основе СМІ и синтетический скаффолд Actifit. 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 [Fox A.J.S. et al. 2015].

Существующие скаффолды имеют ряд недостатков, включая низкую степень интеграции каркасов с капсулой сустава, риск смещения и деформации, что может привести к повторным операциям [Wei W. et al. 2023] . В некоторых случаях происходит уменьшение формы и размеров скаффолда [van Tienen T.G. et al. 2023] , изменения изначальных механических свойств каркасов после имплантации в течении 5 лет. В целом, существует ограниченное количество исследований подтверждающих хондропротекторное действие менисковых каркасов Actifit и CMI [Kohli S. et al. 2022, Potyondy T. et al. 2021].

Исследователи и врачи заинтересованы в разработке идеальной комбинации скаффолда, биостимулирующих молекул и клеток для того, чтобы добиться лучших результатов по восстановлению менисковой ткани [Filardo G. et al. 2015, Lombardo M.D.M. et al. 2021]. Данные технологии еще недостаточно проработаны, чтобы быть рекомендованными к широкому внедрению в клиническую практику. Применение аддитивных технологий как средство производства для создания сложных конструкции представляет большой интерес в травматологии и ортопедии в связи с возможной персонализацией конечного импланта [Котельников Г.П. и др. 2023, Ozeki N. et al. 2021].

Проблема лечения повреждений менисков с помощью регенеративной медицины еще не разрешена. Скаффолд должен обеспечивать стабильную поддержку повреждённой ткани, пока она восстанавливается, а также иметь свойства, которые стимулируют клеточную адгезию, пролиферацию и ангиогенез. Следует не только учитывать сложную трёхмерную структуру мениска и способствовать интеграции с окружающими тканями, но и продумать архитектонику положения всей конструкции внутри коленного сустава [Gersoff W.K. et al. 2015].

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

Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации по грантовому соглашению № 075-15-2024-640 (Сеченовский университет).

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 безопасной и позволяет добиться 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.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс 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).

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).

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 3Д принтере биосовместимым и биоразлагаемым материалом были выполнены лично автором. Автором проведены запланированные эксперименты - имплантация скаффолдов на моделях мелких животных, проанализированы результаты *in vitro* и *in vivo*

экспериментов, проведен анализ лабораторных данных и результатов гистологического исследования и их статистической обработки.

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.

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.

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).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

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 (Рисунок 1).

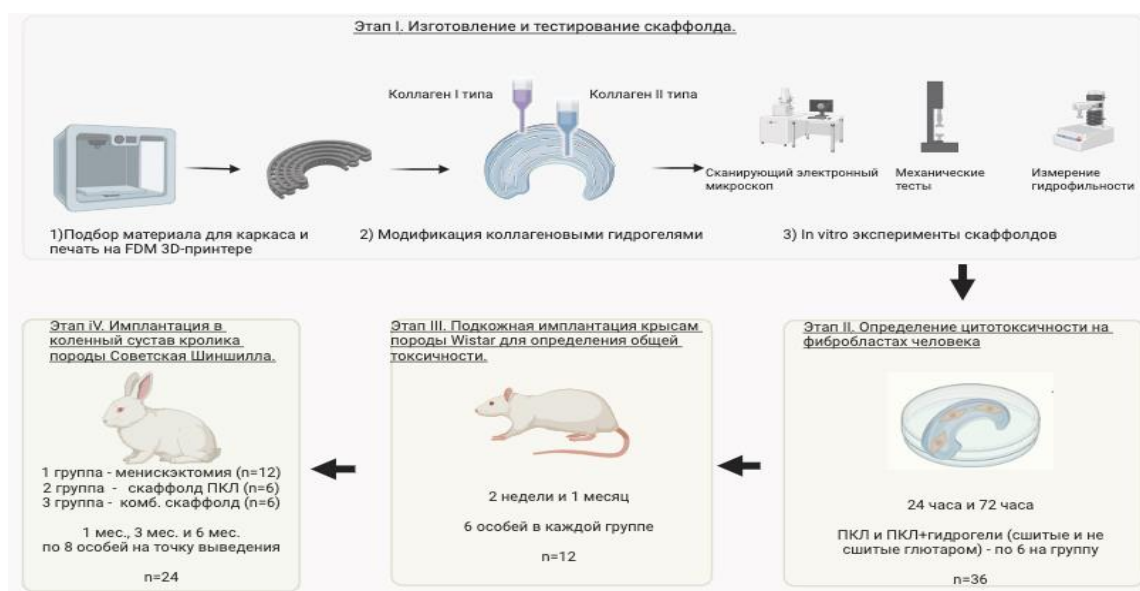


Рисунок 1 – Дизайн диссертационного исследования

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 при помощи Универсальной системы для механических тестов BioMomentum Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc, Лаваль, Канада). Исследовали ПКЛ-скаффолды, напечатанные при различной температуре, а также скаффолды в комбинации с коллагеновыми гидрогелями первого и второго типов. *In vitro* исследования включали в себя оценку

параметров толщины балок и пор на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ). Для определения 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).

На втором этапе исследования была проведена оценка цитотоксичности скаффолдов, которые были разделены на три группы: поликапролактоновые (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.

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 для определения воспалительных реакций и степени деградации материалов была проведена подкожная имплантация 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 биodeградации внутри живого организма.

Для определения функциональности и регенеративных способностей скаффолда проводили четвертый этап исследования в эксперименте *in vivo* на кроликах породы Советская Шиншилла мужского пола весом от 2,5 до 3,5 кг в возрасте 10 месяцев. Общее количество особей в количестве 24 единицы было разделено 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. Во второй группе (экспериментальная группа)

производили имплантацию комбинированного скаффолда (ПКЛ + коллагеновые растворы разных типов, сшитые глютаром) 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. Контрольными точками эксперимента являлись 30-й, 90-й и 180-й день после оперативного вмешательства.

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 (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Слева – длинный парапателлярный хирургический доступ с вывихом надколенника, справа – короткий медиальный доступ

Непосредственно после оперативного вмешательства на протяжении двух недель проводили оценку качества жизни кроликов. Оценка болевого синдрома проводили по классификации шкалы гримас у кроликов 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.

В позднем отдаленном периоде акцентировали внимание на возможности передвижения кроликов, выполнения полного объема движений с использованием модифицированной шкалы оценки опорно-двигательного аппарата Бассо, Битти и Бреснахана (шкала BBB) T. Guo et al. (2018).

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 испытуемых.

Результаты первого этапа исследования

Для решения задачи первого этапа исследования был проведен анализ литературы, на основе которого выбрали поликапролактон (ПКЛ) в качестве каркаса для производства скаффолда мениска коленного сустава. Модификация напечатанного на FDM 3Д принтере каркаса производили 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 ($p < 0,001$).

На основании полученных данных было определено, что оптимальный температурный диапазон для печати поликапролактоновых скаффолдов составляет 130–140 °C ($p < 0,001$) (Рисунок 3). Применение параметры печати на FDM 3Д принтере обеспечивает высокую точность формирования балок и пор, что критически важно для достижения необходимых механических характеристик каркаса мениска ($p < 0,001$).

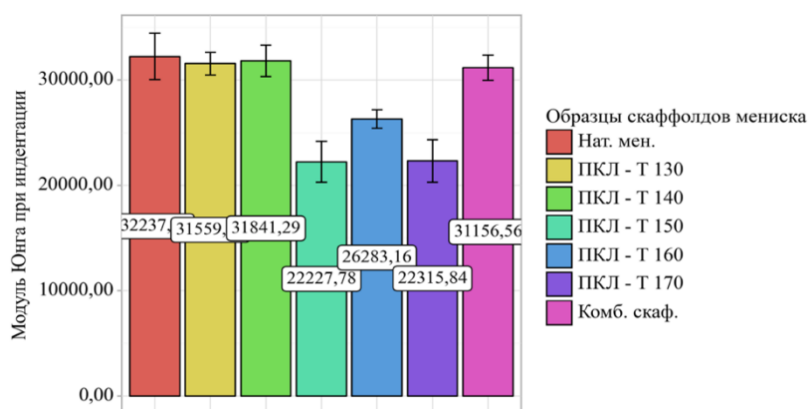


Рисунок 3 – Зависимость изменения параметров жесткости материала от температуры печати

При оценке распределения коллагеновых гидрогелей на СЭМ (Рисунок 4) были отмечены следующие особенности: во внешней части скаффолда отмечались фибриновые структуры, которые покрывали внешние балки. Во внутренней структуре на балках отчетливых разливованных структур не отмечалось. Некоторые поры также были пропитаны раствором коллагена I и II типов.

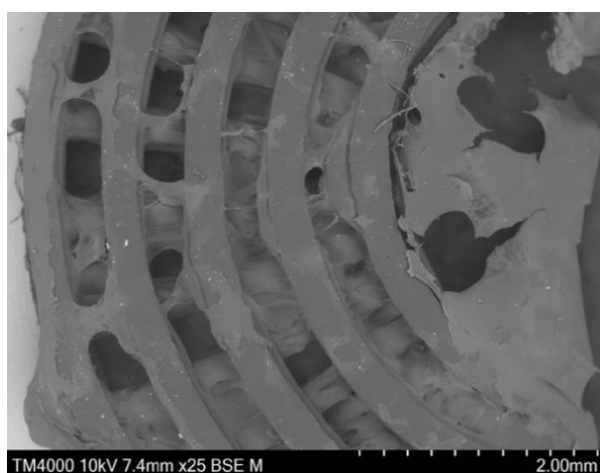


Рисунок 4 – Коллагеновые гидрогели I и II типа между поликапролактоновыми балками на СЭМ

Результаты тестов на гидрофильность ПКЛ-скаффолдов, комбинированных скаффолдов, сшитых и несшитых глютаром на 10-й секунде в зависимости от типа скаффолда были выявлены существенные различия ($p < 0,001$) (Рисунок 5).

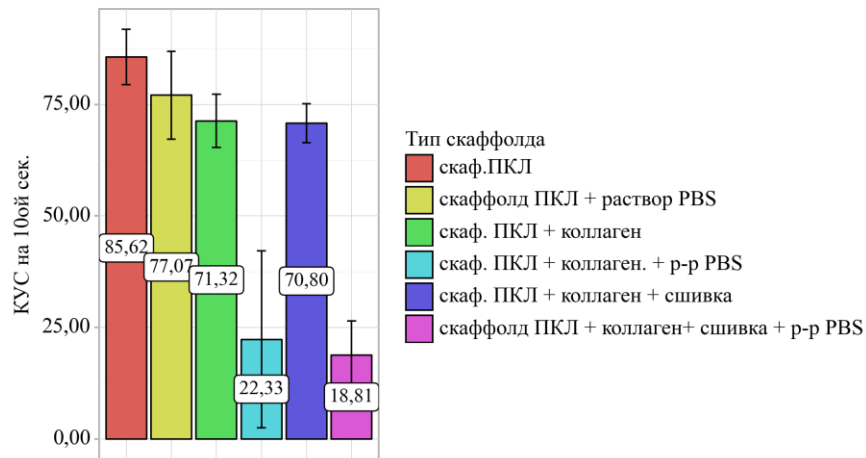


Рисунок 5 – Средние значения КУС капли дистиллированной воды на 10-й секунде на скаффолдах ПКЛ и в комбинации с коллагеном в сшивке глютаром и без сшивки в сухом виде и после 30 минут нахождения в физиологическом растворе

Таким образом, по результатам первого этапа была определена оптимальная температура печати (130-140 °С) поликапролактонового каркаса ($p < 0,001$). Механические свойства напечатанного мениска на сжатие и растяжение сопоставимы со средними показателями нативного мениска ($p < 0,001$). При этом комбинация каркаса с коллагеновыми гидрогелями при визуальной оценке на СЭМ остается на скаффолде и дает наименьший угол в смоченном в физиологическом растворе состоянии ($p < 0,001$), что показывает на лучшие адгезионные свойства для клеток.

Результаты определения цитотоксичности скаффолдов (2 этап)

Результаты теста на цитотоксичность продемонстрировали, что фибробласты сохраняли высокую жизнеспособность (более 90%) на комбинированных скаффолдах, содержащих как сшитые, так и несшитые коллагеновые гидрогели ($p < 0,001$) (Рисунок 6). Кроме того, комбинация поликапролактоновой 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 её высоком потенциале для применения в тканевой инженерии ($p < 0,001$).

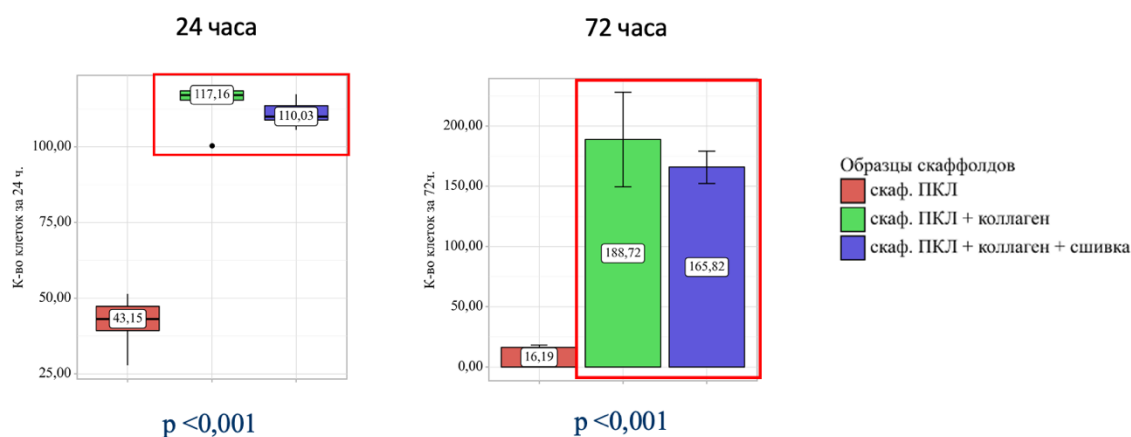


Рисунок 6 – Количество клеток на скаффолдах за 24 часа и 72 часа в зависимости от образца скаффолда

Результаты экспериментов in vivo (3 и 4 этапы)

Гистологическая картина скаффолдов после имплантации не выявила выраженной воспалительной реакции как со стороны поликапролактоновой основы, так и её комбинаций с коллагенами, сшитыми и несшитыми глютаровым альдегидом. В ходе анализа количества макрофагов на 14ые сутки ($p = 0,135$) и 30ые сутки ($p = 0,343$) не удалось выявить статистически значимых различий. Было отмечено формирование фиброзоподобной ткани, способной частично замещать поликапролактоновую основу скаффолдов, что свидетельствует о хорошей биосовместимости материала. Сшитые глютаром коллагеновые гидрогели, нанесённые на поликапролактоновую основу, сохранялись в имплантатах спустя 30 суток после трансплантации (Рисунок 7). Это указывает на их потенциально длительное присутствие и устойчивость в биологической среде, что делает такие материалы перспективными для дальнейшего использования в доклинических этапах.

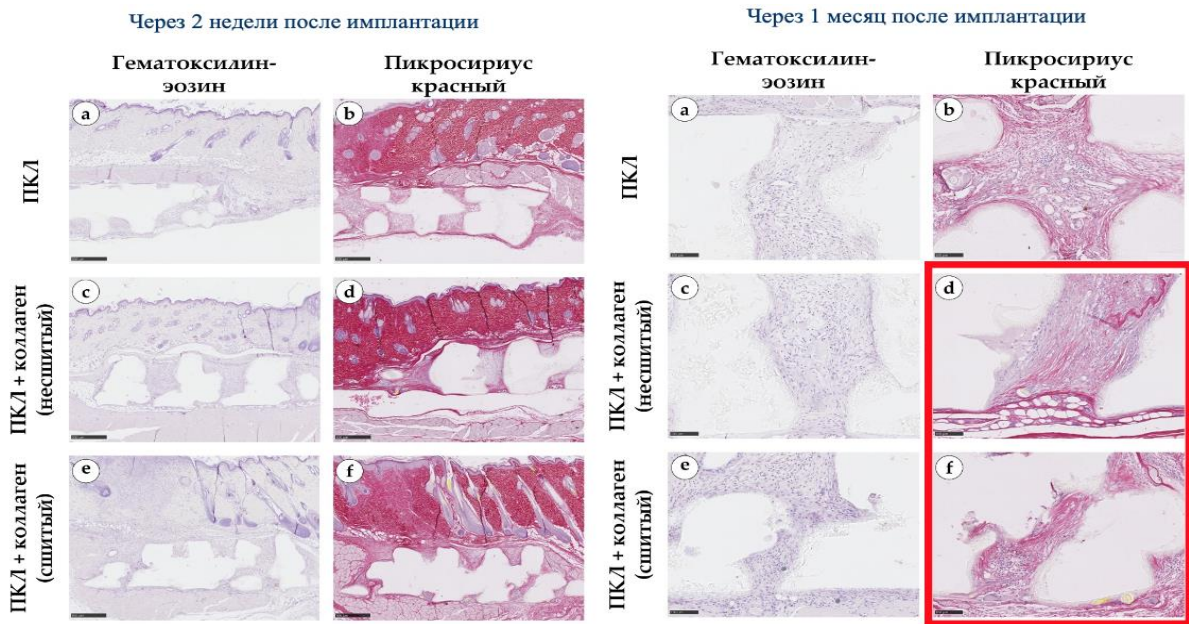


Рисунок 7 – Участки имплантации ПКЛ скаффолдов без коллагена (a,b), ПКЛ скаффолдов с коллагеном (с,d) и ПКЛ скаффолдов со сшитым коллагеном (e,f), 14 дней и через 1 месяц после имплантации, окраски гематоксилином-эозином и пикросириусом красным, увеличение $\times 200$

Результаты экспериментов *in vivo*, проведённых на моделях Советской шиншиллы, демонстрируют значительный потенциал скаффолдов из поликапролактона и гибридных каркасов из поликапролактона, 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 показатели механических тестов на комбинированном скаффолде были выше в сравнении с поликапролактоновым аналогом ($p < 0,001$). На шестом месяце после имплантации комбинированный скаффолд продемонстрировал существенно лучшие показатели механической прочности при индентации (2,9 МПа), превосходя результаты группы скаффолда из поликапролактона ($p < 0,001$). Кроме того, анализ модуля Юнга при растяжении выявил заметное превосходство гибридного каркаса. Так, на первом и третьем месяцах после имплантации модуль Юнга составил 3,5 МПа и 4,4 МПа соответственно, что значительно превосходит аналогичные показатели поликапролактонового скаффолда (Рисунок 8). Таким образом, использование гибридного каркаса из поликапролактона, дополненного коллагеновыми гидрогелями, позволяет достичь лучших биомеханических

характеристик и способствует более эффективной регенерации ткани мениска ($p < 0,001$).

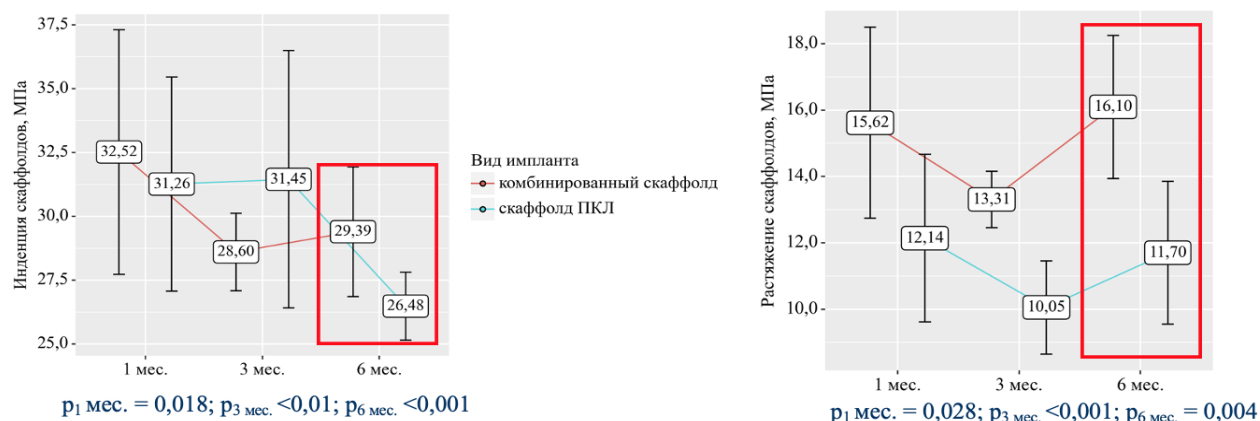


Рисунок 8 – Слева – результаты механического тестирования скаффолдов на инденцию скаффолдов в зависимости от вида импланта; справа – Количественные показатели растяжения скаффолдов на трех постимплантационных временных промежутках в зависимости от вида скаффолда

В рамках проведённого исследования следует предложить применение малого медиального хирургического доступа для имплантации скаффолдов мениска, что обусловлено его преимуществами в предотвращении дислокации имплантата (Рисунок 9).



	Хирургический доступ		p
	Длинный парамедиальный	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 9 – Дислокации скаффолдов в зависимости от вида хирургического доступа (кол-во наблюдений)

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 малого 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 отёка коленного сустава уменьшилась на 10% во всех временных точках раннего послеоперационного наблюдения ($p < 0,001$) (Рисунок 10). 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 отдалённых сроков послеоперационного периода не было выявлено статистически значимых различий в количественных классификациях между двумя хирургическими доступами. Это свидетельствует о том, что выбор малого медиального доступа обеспечивает сопоставимые результаты по эффективности и качеству регенерации тканей, сохраняя при этом преимущества в раннем послеоперационном периоде.

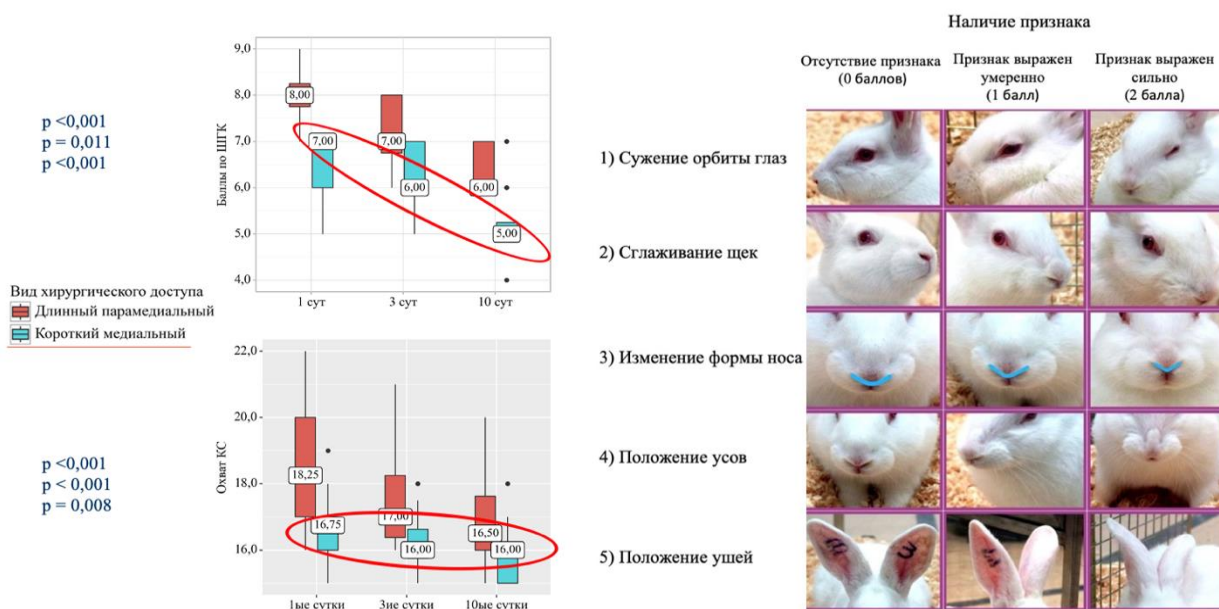


Рисунок 10 – Средние значения баллов по шкале гримас кроликов в зависимости от вида хирургического доступа

В позднем послеоперационном периоде функциональная активность задних конечностей кроликов оценивалась с использованием Шкалы подвижности ВВВ, 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 первом и шестом 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 ВВВ. 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, проведённого с использованием шкалы Ishida, показали, что комбинированные скаффолды существенно превосходят поликапролактоновые скаффолды в эффективности регенерации тканей мениска в отдалённые сроки. На шестом месяце после имплантации комбинированные скаффолды демонстрировали на 16% 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.

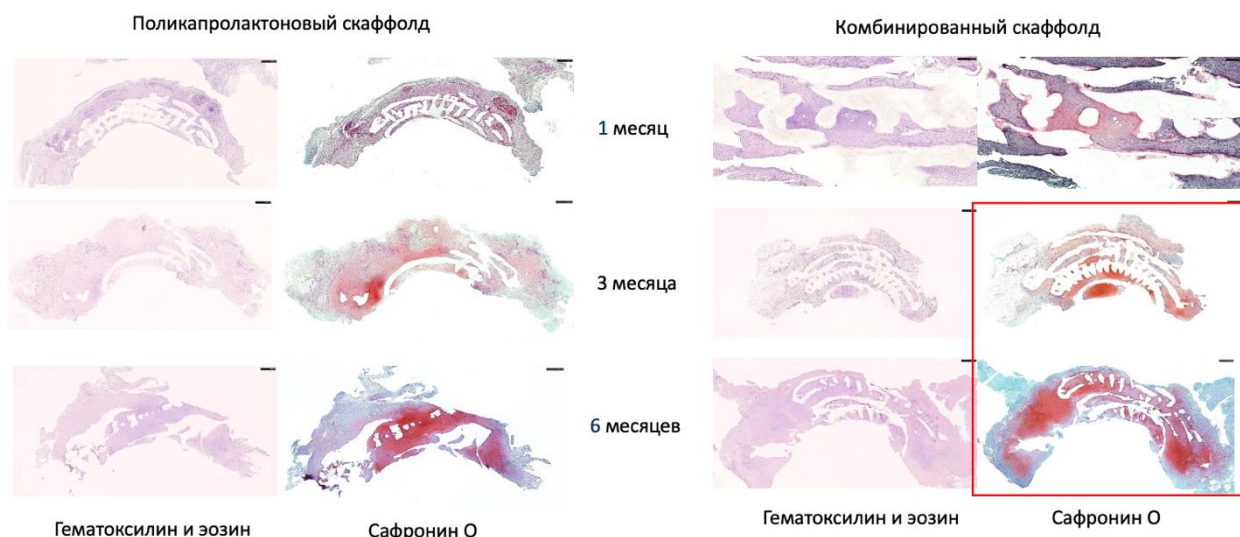


Рисунок 11 – Гистологическая картина скаффолдов на разных временных промежутках при окраске гематоксилином и эозином и сафронином O

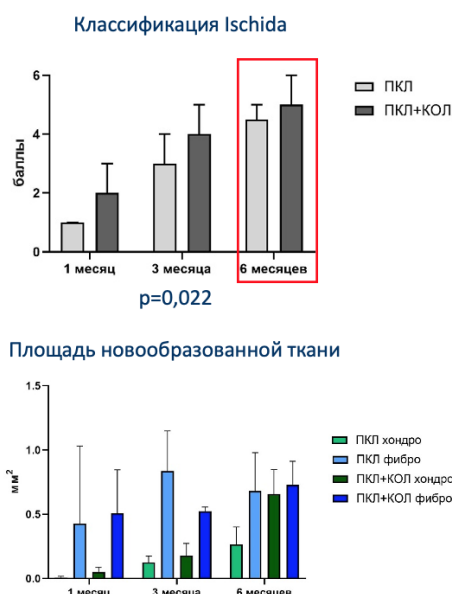


Рисунок 12 – Морфометрический анализ влияния состава имплантата на регенерацию хрящевой ткани мениска. Балльная оценка по Ishida (а) и количественная оценка размеров площадей хрящевых регенератов из хондроцитоподобных и фибробластоподобных клеток (б) в ткани мениска

Данные представлены в виде медиан и 95% доверительного интервала (а), а также в виде среднего значения и стандартного отклонения (б)

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 подчёркивает способность комбинированного скаффолда снижать риск

Классификация Ishida

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 O регенерирующей ткани	Не окрашено	0
	Слабо окрашено	1
	Интенсивно окрашено	2
Общая сумма баллов		6

дегенерации хрящевых тканей, поддерживая их морфофункциональную целостность, в то время как ПКЛ-скаффолды обеспечивали менее выраженную защиту.

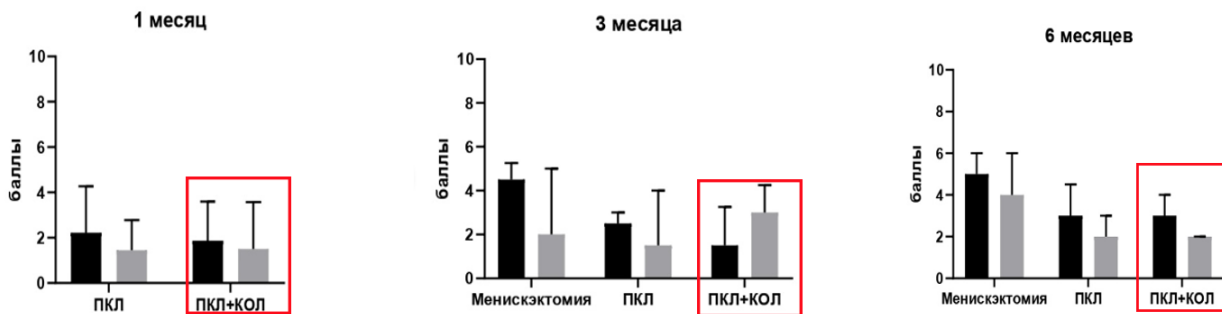


Рисунок 13 – Оценка хрящевых поверхностей по шкале Mankin на трех временных промежутках

Таким образом, комбинированные скаффолды демонстрируют превосходство над поликапролактоновыми аналогами как в отношении регенерации тканей мениска, так и в аспекте защиты суставного хряща.

Данное диссертационное исследование может подтвердить, что гибридный каркас на поликапролактоновой основе с содержанием коллагеновых гидрогелей разных типов может успешно способствовать регенерации всего мениска, переносить должную механическую нагрузку и защищать суставной хрящ от повреждений.

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 медиальный доступ дислокации каркасов не отмечено, а боль и отек коленных суставов в раннем послеоперационном периоде снизились на 10 %, тогда как после имлантации через передний доступ с вывихом надколенника дислокация скаффолдов через 3 месяца наступила у 33 % особей. Кроме того, через 6 мес двигательные способности по шкале BBB после имплантации скаффолда через 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 шкалам ICRS 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кудрачев, Т.Р.** 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.

2. 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

3. Оценка остеointеграции 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. Серезникова, 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.57–66.

4. Raikov, B. 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 – № 1 – P.30

СОКРАЩЕНИЯ

КУС – контактный угол смачивания

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПКЛ - поликапролактон

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

ШГК – шкала гримас кролика

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

FDM – Fused Deposition Modeling – послойное наплавление объекта

WORMS - Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score