

Бур'янов О.А.<sup>1</sup>, Лябах А.П.<sup>3</sup>, Дедух Н.В.<sup>2</sup>, Омельченко Т.М.<sup>1</sup>, Чернопол П.А.<sup>1</sup>, Турчин О.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені проф. М.І. Ситенка НАМН України», м. Харків, Україна

<sup>3</sup>ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ, Україна

## Застосування аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, при лікуванні остеохондральних дефектів в експерименті на тваринах

**Резюме. Актуальність.** Застосування аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами (PRP — platelet rich plasma) є перспективною та вельми популярною методикою, що використовується з метою покращання регенерації уражених тканин опорно-рухового апарату. Однак недостатня доказова база обумовлює необхідність проведення досліджень щодо ефективності даного методу лікування. **Мета дослідження:** в експерименті на 24 тваринах (кролі) шляхом морфологічних досліджень та морфометричного аналізу оцінити ефективність застосування PRP при лікуванні внутрішньосуглобових остеохондральних пошкоджень та дефектів. **Матеріали та методи.** Морфометричний аналіз препаратів, отриманих від 24 експериментальних тварин, які були розподілені на три групи (2 контрольні та 1 дослідна), проводили для визначення характеру та структури регенерату, його інтеграції до оточуючих тканин, оцінки вмісту клітинних структур та неклітинних елементів, що сформувалися в дефекті в різних серіях експерименту, з використанням модифікованої шкали S.W. O'Driscoll et al. та S.R. Frenkel et al. **Результати.** Аналіз результатів дослідження з використанням модифікованої шкали гістологічної оцінки показав, що гіаліновий хрящ був наявний тільки в регенераті дослідних тварин серії 3, у яких застосовували PRP. Істотного розширення поверхні в цих тварин не виявлено, структурна інтегрованість була високою, щільність суглобового хряща навколо країв дефекту значно перевищувала показники контролю. Дегенеративні зміни хондроцитів переважали в контрольних тварин. Перебудова субхондральної кістки під зоною дефекту статистично відрізнялася в дослідній та контрольних групах тварин. При статистичному аналізі виявлено вірогідну різницю між дослідною та контрольними групами ( $P < 0,001$ ,  $t = 4,8$ ), що свідчить про ефективність застосування PRP. **Висновки.** Результати роботи підтвердили ефективність застосування PRP для лікування пацієнтів із внутрішньосуглобовими остеохондральними пошкодженнями та дефектами.

**Ключові слова:** остеохондральні пошкодження; регенерація хряща; регенеративні технології; PRP (platelet rich plasma); BMDCT (bone marrow-derived cell transplantation)

### Вступ

Захворювання, що характеризуються обмеженим субхондральним некрозом суглобової поверхні кістки (розсікаючий остеохондрит), були описані F. König (1888), M. Karpis (1922) та J. Dias (1928) і мають посттравматичний або переважувальний генез. Лише в 10–30 % хворих з остеохондральним пошкодженням (ОХП), що проявляється обмеженим остеонекрозом, не вдається довести його травматичне походження [1]. Незалежно від тривалості консервативного лікування вони мають тенденцію до прогресування дегенератив-

ного процесу з кінцевим наслідком у термінальну стадію остеоартрозу [2]. У дорослих пацієнтів спонтанне загоєння ОХП спостерігається вкрай рідко [3]. В огляді 14 досліджень Tol та ін. [4] виявили, що консервативне лікування було ефективним у зменшенні клінічних симптомів, передусім больового синдрому, лише в 59 % пацієнтів, які страждають від ОХП у I стадії.

Сучасний комплекс регенеративних технологій у лікуванні даної категорії пацієнтів включає хірургічні методи лікування в поєднанні із застосуванням клітинних і тканинних технологій, що полягають у приско-

ренні диференціації та росту клітин ураженої тканини, активації їх метаболізму, створенні умов для відновлення кровопостачання й оптимізації функціональних умов новоутвореного регенерату. Серед реконструктивно-відновних хірургічних методів найбільш ефективними є артроскопічний або відкритий дебридмент, видалення вільних хондральних або остеохондральних тіл, лаваж, елементи абразивної хондропластики (шейверування, вапоризація), мікрофрактуринг або тунелізація кісткової тканини в зоні дефекту, остеохондральна автотрансплантація (мозаїчна остеохондропластика) [5–9]. Однією з перспективних методик, що дозволяє стимулювати метаболізм та регенерацію кістково-хрящової тканини, прискорити диференціацію та ріст клітин ушкоджених тканин, прискорити загоєння дефекту, є застосування аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами (PRP) або тромбоцитарними факторами росту (PRGF) [10, 11]. Сьогодні вказані методи широко застосовуються як елементи регенераторної терапії при пошкодженнях кістково-хрящової тканини, сухожильно-м'язового та капсульно-зв'язкового апарату.

У сучасній літературі зустрічаються результати досліджень щодо ефективності PRP для формування гіалінової хрящової тканини в зоні її пошкодження та поліпшення біологічного синовіального середовища, в якому хрящ може відновлюватися як при консервативному, так і після хірургічного лікування [10–12]. Було показано кращі результати лікування пацієнтів із застосуванням цих методів, однак кількість досліджень, а також їх застосування в комбінаціях з іншими методиками лікування не дозволяють вірогідно оцінити їх вплив, що потребує проведення додаткових експериментальних та клінічних досліджень.

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

## Матеріали та методи

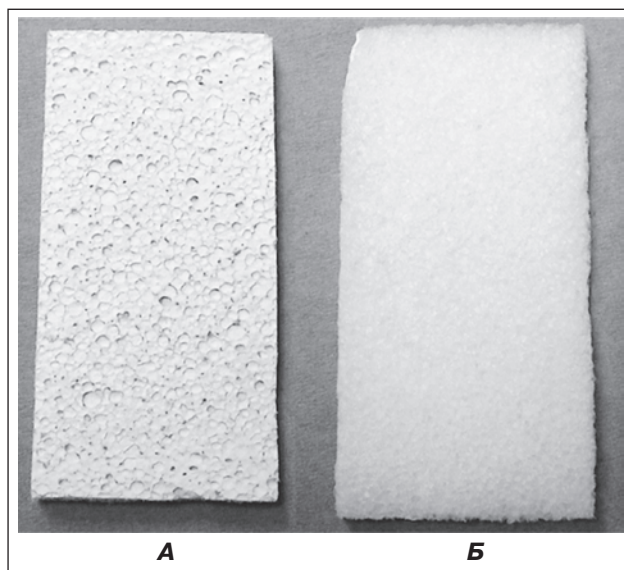
Проведено 3 серії експериментів, що виконані на 24 кроликах (жива маса — 3800–4200 г). Вік тварин до початку експерименту був 11–12 місяців [13].

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

2-га серія — піддослідні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали колагеново-фібриною матрицею (рис. 1) (8 об'єктів дослідження).

3-тя серія — піддослідні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали плазмою, збагаченою тромбоцитами в колагеново-фібриновій матриці (8 об'єктів дослідження).

При контакті колагеново-фібринової матриці (пластини) з поверхнею дефекту активується перетворення фібриногену у фібрин, що супроводжується значною адгезією матриці до ложа дефекту. В подальшому відбувається полімеризація фібринового покриття з



**Рисунок 1. Колагеново-фібринова матриця (пластина) (Тахокомб виробництва Takeda). З одного боку (А) пластина виконана з колагену (колагенова матриця, що містить колаген І типу із сухожилка коня). З іншого боку (Б) на колагенову матрицю нанесено ліофілізований людський фібриноген, тромбін, апротинін та рибофлавін**

утворенням еластичного герметичного тканинного каркасу, що закриває дефект. Упродовж 4–6 тижнів відбуваються повна біодеградація колагеново-фібринової матриці та її заміщення регенератом. Асептичні властивості пластини закладені в технологічних процесах її виробництва.

Хірургічне втручання проводили під кетаміновим наркозом (100–150 мг) із місцевою анестезією 0,5% розчином новокаїну. Тварин фіксували на операційному столі. Оперативні втручання виконували на двох нижніх кінцівках. Після підготовки операційного поля скальпелем проводили розріз шкіри передньомедіальної поверхні колінного суглоба. Розсікали м'які тканини, бором відтворювали остеохондральний дефект у медіальному виростку стегнової кістки критичного розміру діаметром 3 мм, глибиною 5 мм (рис. 2). Спицею виконували тунелізацію виростка з дефекту. Ділянку оперативного втручання заповнювали ліофілізованою колагеново-фібриною матрицею, до складу якої входили тромбін, фібриноген та колаген із сухожилків коня з переважним вмістом колагенових волокон І типу.

Плазму, збагачену тромбоцитами, отримували так. В шприц об'ємом 5 мл набирали цитрат (CPDA-1 — Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution) об'ємом 0,5 мл. На наступному етапі виконували забір крові інтракардіально (до 5 мл) (рис. 3).

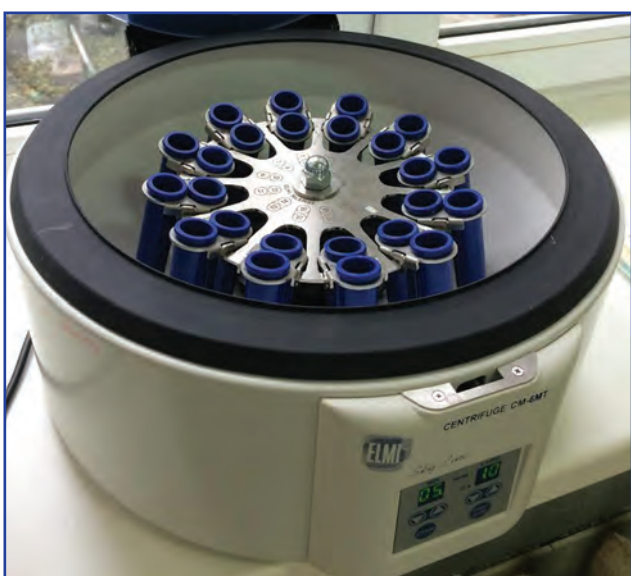
Після цього 0,5 мл отриманої суміші забирали для проведення загального аналізу крові, а іншу частину (4,5 мл) ставили в центрифугу (ELMI Centrifuge CM-6 MT, Sky line, рис. 4).



**Рисунок 2.** Створення дефекту кісткової тканини (3 мм) у медіальному виростку стегнової кістки



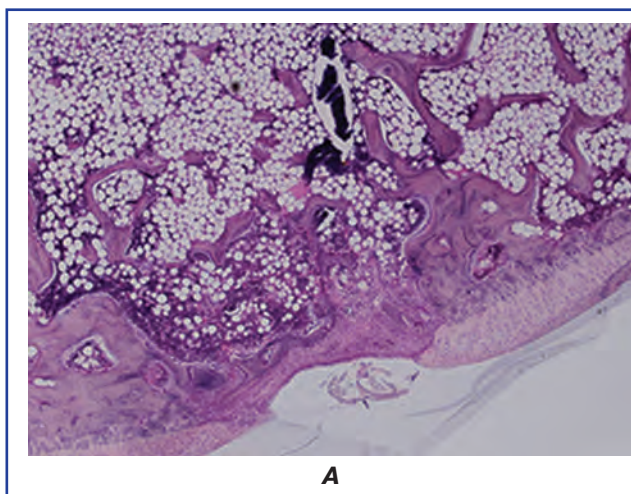
**Рисунок 3.** Забір крові в експериментальній тварині (інтракардіально)



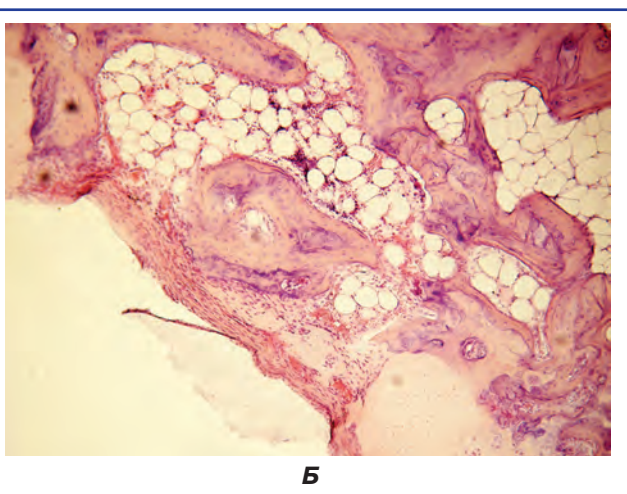
**Рисунок 4.** Вигляд центрифуги ELMC Centrifuge CM-6 MT, Sky line



**Рисунок 5.** Забір плазми, збагаченої тромбоцитами, з центрифугованого препарату

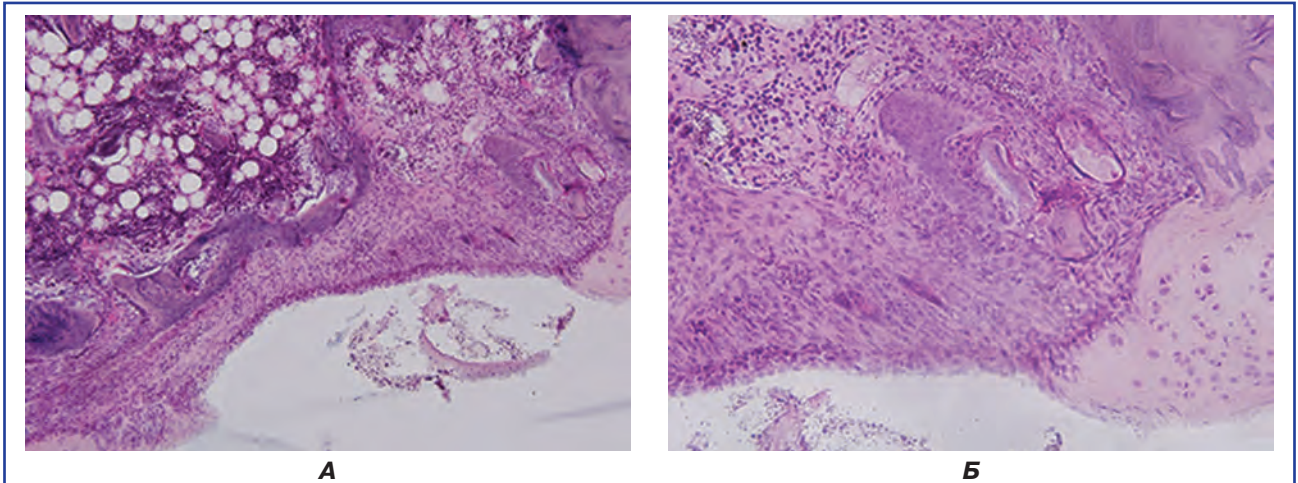


**А**

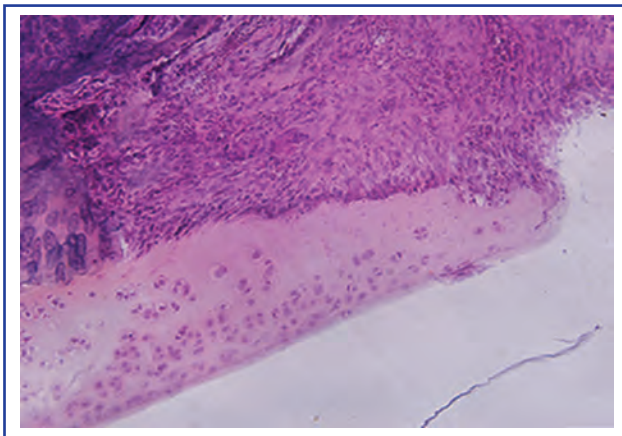


**Б**

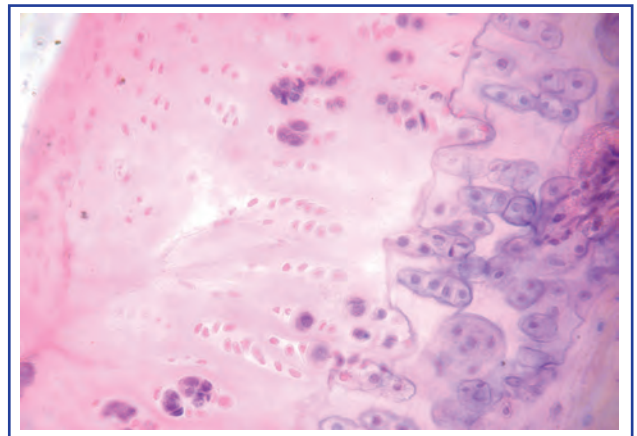
**Рисунок 6.** Фотовідбитки з препаратів 1, 3. Ділянки кістково-хрящового дефекту у двох кролів 1-ї серії. А. Крайові відділи суглобового хряща спаяні сполучною тканиною. Б. Тонкий прошарок волокнистого хряща між краями суглобового хряща. Контрольна серія. Гематоксилін та еозин. А. 36. × 40. Б. 36. × 100



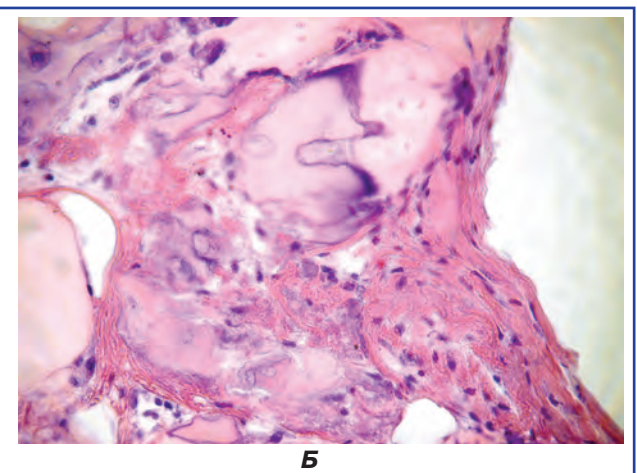
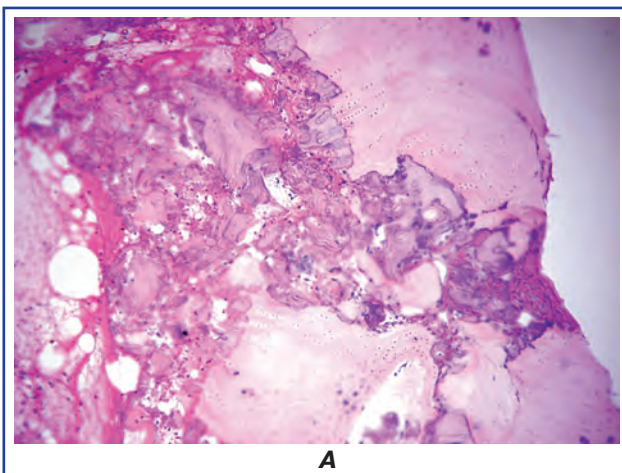
**Рисунок 7.** Фотовідбиток із препарату 5. А. Ділянка кістково-хрящового дефекту, заповнена сполучною тканиною. Б. Фрагмент рис. 7А. Розширені кровоносні судини. Контрольна серія. Гематоксилін та еозин. А. 3б. × 40. Б. 3б. × 100



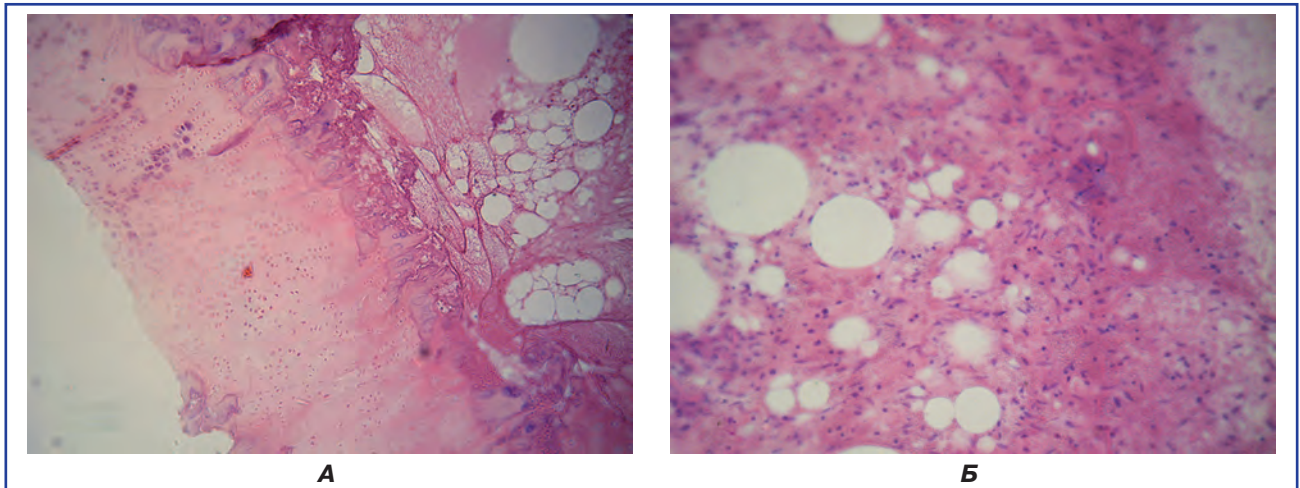
**Рисунок 8.** Фотовідбиток із препарату 7. Суглобовий хрящ із низькою щільністю та нерівномірним розташуванням хондроцитів у ділянках, що прилягають до дефекту. Хондроцити з пікнотичними ядрами. Контрольна серія. Гематоксилін та еозин. 3б. × 100



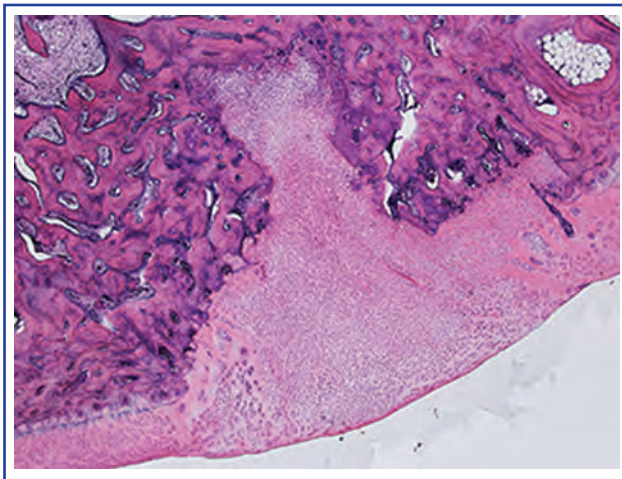
**Рисунок 9.** Фотовідбиток із препарату 10. Ділянка деструкції суглобового хряща на відстані від дефекту. Лізис хондроцитів. Поодинокі ізогенні групи клітин. Контрольна серія. Гематоксилін та еозин. 3б. × 400



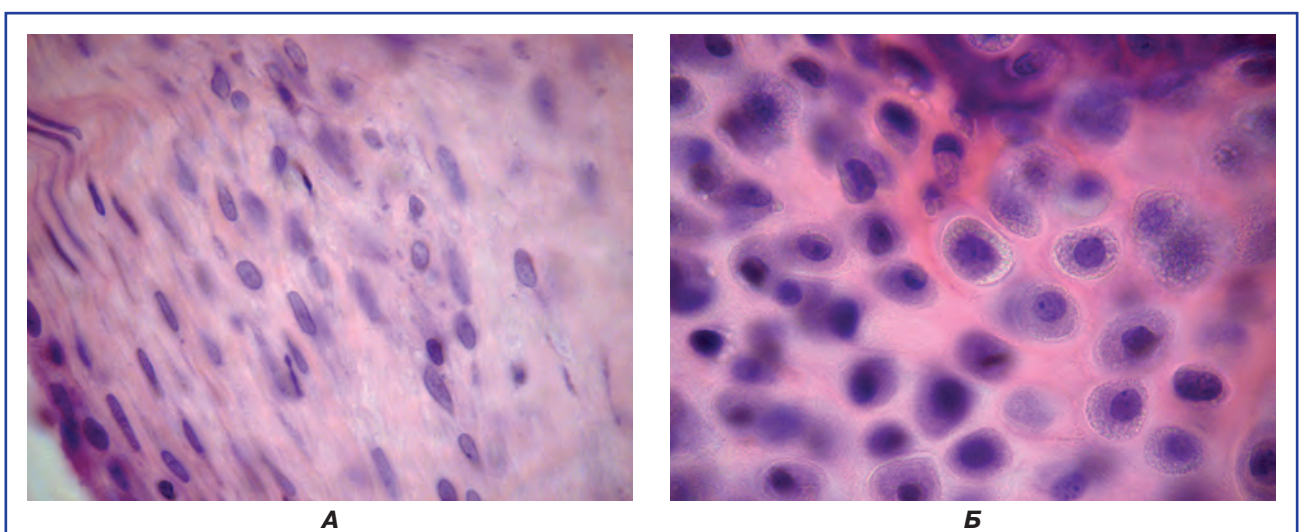
**Рисунок 10.** Фотовідбиток із препарату 9. Ділянка травматичного ушкодження суглобового хряща. А. Поля сполучної тканини, розширені кровоносні судини, кистоподібні порожнини. Кісткові секвестри. Б. Щільна сполучна тканина в крайовому відділі дефекту з рідко розташованими фібробластами. Дослідна серія 2. А. 3б. × 100. Б. 3б. × 200



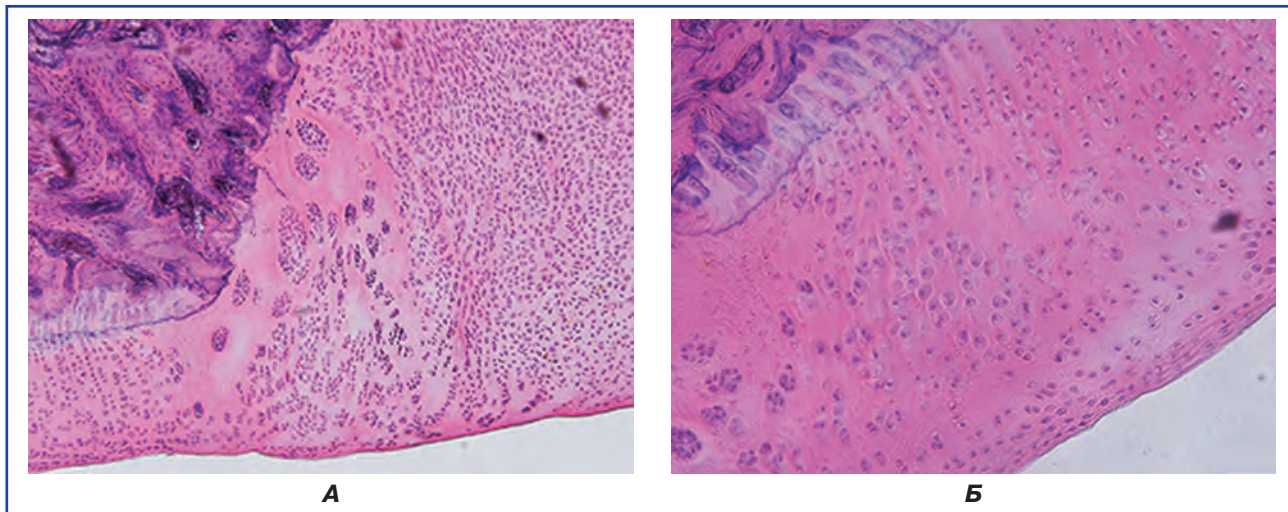
**Рисунок 11. Фотовідбиток із препарату 12. А. Суглобовий хрящ над ділянкою травматичного ушкодження. Великі ділянки без клітин. Пікноз хондроцитів. Б. Грануляційна тканина в ділянці дефекту. Розширені кровоносні судини. Дослідна серія 2. Гематоксилін та еозин. Зб.  $\times 100$**



**Рисунок 12. Фотовідбиток із препарату 17. Ділянка дефекту в суглобовому хрящі та губчастій кістковій тканині заповнена хондроїдом із високою щільністю фіброхондроцитів і хондробластів. Дрібнопетляста мережа з кісткових трабекул, прилеглих до ділянки травматичного ушкодження. Дослідна серія 3. Гематоксилін та еозин. Зб.  $\times 40$**



**Рисунок 13. Фотовідбиток із препарату 19. Регенерат у дефекті суглобового хряща. А. Поверхнева зона над дефектом. Фіброхондроцити та хондробласти. Б. Хондробласти та поодинокі хондроцити в глибокій ділянці дефекту. Дослідна серія 3. Гематоксилін та еозин. А. Зб.  $\times 400$ . Б. Зб.  $\times 1000$**



**Рисунок 14. Фотовідбиток із препарату. Ділянка зрощення новоутвореної хрящової тканини із суглобовим хрящем. Ізогенні групи клітин. А. Суглобовий хрящ, що прилягає до дефекту з латерального боку. Б. Суглобовий хрящ, що прилягає до дефекту з медіального боку. Дослідна серія 3. Гематоксилін та еозин. А. 36. × 100. Б. 36. × 200**

Центрифугування проводили за такими параметрами: в одну комірку вставляли шприц із цитратом та кров'ю, у протилежну — шприц із 4,5 мл фізіологічного розчину (для балансу). Кількість обертів за хвилину — 1000. Тривалість — 5 хвилин.

Після завершення центрифугування виконувався забір плазми (рис. 5).

Тварини всіх серій були виведені з експерименту на 40-ву добу шляхом введення в одну з вухних вен 0,5–1,0 мл 10% розчину тіопенталу натрію. Вибір цього терміну дослідження для дефектів критичного розміру пов'язаний із тим, що тільки в умовах стимуляції ре-

парації можлива повна регенерація кістково-хрящових структур.

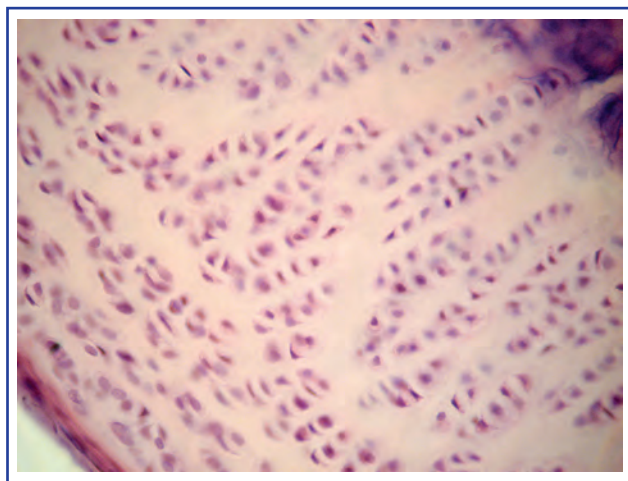
Робота з тваринами виконувалася відповідно до правил Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин, які використовують для експериментальних та інших наукових цілей [14, 15], а також відповідно до Законодавства України [16]. План експериментальних досліджень був затверджений Комітетом із біоетики при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця від 01.09.2016 р.

На всіх етапах експерименту оцінювали рухову активність кроликів, особливості харчування й опороспроможність кінцівки з дефектом. На 1-шу — 5-ту добу тварини берегли кінцівку, а повне навантаження зафіксоване після 5 діб. На етапах експерименту харчування тварин не було порушене.

Макроскопічний аналіз проводили після виведення тварин з експерименту під час підготовки стегнової кістки до фіксації.

У всіх кроликів виділяли стегнову кістку з ділянкою дефекту. Кістки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, декальцинували в 5% розчині азотної кислоти, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності (від 60 до 96°), а також у суміші етилового спирту з діетиловим ефіром (у співвідношенні 1 : 1). Зразки укладали в целоїдин, блоки ущільнювали в густому целоїдині під парами хлороформу. Виготовляли зрізи товщиною 7–10 мкм, які забарвлювали гематоксиліном й еозином, а також пікрофуксином за ван Гізеном (Коржевський Д.Е., 2010) [17]. Аналіз і фотографування матеріалу проводили під мікроскопами AxioStar Plus і MICROS. При мікроскопічному аналізі досліджували ділянку дефекту і прилеглі материнські кістку та хрящ.

Морфометричний аналіз здійснювали для визначення характеру та структури регенерату, його інтеграції до оточуючих тканин, оцінки вмісту клітинних



**Рисунок 15. Фотовідбиток із препарату 21. Суглобовий хрящ на відстані від дефекту. У поверхневій зоні хондроцити видовженої форми. У проміжній зоні суглобового хряща хондроцити округлої форми з ядрами, виконаними пухким хроматином. Хондроцити оточені капсулою. Дослідна серія. 36. × 400**

структур та неклітинних елементів, що сформувалися в дефекті в різних серіях експерименту з використанням модифікованої шкали S.W. O'Driscoll et al. и S.R. Frenkel et al. (табл. 1) [13]. Досліджували відносну площу новоствореної тканини в остеохондральному дефекті за допомогою квадратно-сітчастої окулярної вставки (на площі 19 600 мкм<sup>2</sup>) за методикою Г.Г. Автанділова, підраховуючи кількість точок (перетинів квадратів), які потрапляли на кісткову тканину (Автанділов Г.Г., 1990). Показники відтворювали у відсотках.

## Результати

**Результати дослідження в першій серії експериментальних тварин.** 1-ша серія — контрольні тварини, відтворювали стандартний дірчастий (3 мм) остеохондральний дефект на медіальному виростку стегнової кістки глибиною 5 мм (8 об'єктів дослідження). Виведення з експерименту на 40-ву добу після хірургічного втручання. Морфологічна оцінка результатів.

За макроскопічним дослідженням ділянка дефекту чітко визначалася у вигляді поглиблення на поверхні суглобового хряща і відсутності блиску в прилеглих до дефекту ділянках. На інших віддалених ділянках суглобовий хрящ мав характерний блиск, порушень будови у вигляді ерозій не було виявлено.

Мікроскопічно крайові відділи суглобового хряща були спаяні вузькою смужкою регенерату, представленого сполучною тканиною або волокнистим хрящем (рис. 6А, Б). Конгруентність суглобового хряща порушена за рахунок формування поглиблень над ділянкою дефекту.

Ділянка травматичного ушкодження в суглобовому хрящі, що проникає в кісткову тканину, заповнена трьома видами тканин — грануляційною, що включає розширені кровоносні судини і незрілі сполучнотканинні клітини, а також фіброзною тканиною з високою щільністю фібробластів, що межувала з вогнищами волокнистої хрящової тканини (рис. 7А, Б). Остання розташовувалася в субхондральних ділянках, прилеглих до материнського суглобового хряща.

Сполучна тканина в ділянці дефекту характеризувалася високою щільністю клітин фібробластичного диферону, розташованих серед різноспрямованих пучків колагенових волокон. Клітини мали різну форму ядер — від подовженої до овальної, вони розрізнялися об'ємом цитоплазми. У поверхневому відділі переважали клітини з невеликими округлими базофільними ядрами. Щільність клітин у поверхневій зоні була значно вищою, ніж у розташованих нижче ділянках дефекту.

У глибоких відділах дефекту виявлено грануляційну тканину з округлими незрілими сполучнотканинними клітинами та високою щільністю судин із розширеними просвітами.

На ділянках безпосередньо під суглобовим хрящем, прилеглим до дефекту, розташовувалися розширені кровоносні судини (рис. 8). У таких ділянках суглобовий хрящ характеризувався низькою

щільністю хондроцитів та їх нерівномірним розташуванням. Більшість клітин мали ядра з ознаками пікнозу (рис. 8).

У однієї тварини в зоні дефекту виявлені вузькі поля грануляційної тканини з розширеними кровоносними судинами в глибоких відділах і великі вогнища клітинного і тканинного детриту. На великих поверхнях суглобового хряща, що прилягають до ділянки дефекту, були відсутні хондроцити.

На прилеглих ділянках суглобового хряща, розташованих вище або нижче від зони травматичного ушкодження, конгруентність була порушена, великі поля були без хондроцитів або з високою щільністю хондроцитів із пікнотичними ядрами (рис. 9).

Кісткова тканина, що прилягала до ділянки травматичного ушкодження, формувала великопетлясту мережу, що складалася з кісткових трабекул, які розрізнялися товщиною. Щільність остеоцитів на поверхні трабекул та остеобластів по їх крайовій поверхні була низькою. Кісткові трабекули, прилегли безпосередньо до ділянки дефекту, на ділянках були без остеоцитів.

**Результати дослідження в другій серії експериментальних тварин.** 2-га серія — піддослідні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали колагеново-фібриновою матрицею (8 об'єктів дослідження). Виведення з експерименту на 40-ву добу після хірургічного втручання. Морфологічна оцінка результатів.

Макроскопічні дослідження. Ділянка дефекту в суглобовому хрящі чітко визначається, за рахунок неї порушена конгруентність в цій ділянці та спостерігається втрата характерного блиску в хрящі, що її оточує.

Мікроскопічні дослідження. Крайові відділи суглобового хряща, що прилягають до відтвореного дефекту, спаяні вузькою смужкою сполучної тканини, що складається з щільних пучків колагенових волокон із рідко розташованими між ними фібробластами (рис. 10А, Б).

У ділянках дефекту, що проникає через губчасту кісткову тканину, виявлено поля пухкої сполучної тканини з тонкими пучками колагенових волокон, поодинокими фібробластами поміж них та розширеними кровоносними судинами (рис. 10, 11). Між сполучною тканиною розташовувалися кісткові секвестри і кістоподібні порожнини з гомогенним вмістом. Суглобовий хрящ, що прилягає до ділянки дефекту, на значній території без хондроцитів (рис. 10А). Порушення будови суглобового хряща у вигляді значних ділянок без клітин виявлено й у відділах, що розташовані вище або нижче ділянки дефекту (рис. 11А). На відстані від дефекту щільність хондроцитів була низькою, більшість клітин мали пікнотичні ядра. В таких ділянках позиційно-специфічна організація, що характерна для суглобового хряща, а саме розподіл на поверхневу, проміжну та глибоку зони, була порушена.

Губчаста кісткова тканина, прилегла до ділянки травматичного ушкодження, з деструктивними змінами кісткових трабекул. Репаративний остеогенез виражений слабо. Виявлені лише вогнища остеоїду та кісткові нашарування на поверхні трабекул.

**Результати дослідження в третій серії експериментальних тварин.** 3-тя серія — піддослідні тварини. Остеохондральний дефект заповнювали плазмою, збагаченою тромбоцитами, в колагеново-фібриновій матриці (8 об'єктів дослідження). Виведення з експерименту на 40-ву добу після хірургічного втручання. Морфологічна оцінка результатів.

**Макроскопічні дослідження.** Поверхня суглобового хряща була конгруентна і мала характерний блиск, за винятком ділянки дефекту. Над зоною дефекту характерний блиск був відсутній, на решті території суглобового хряща поверхня була з глянцевою блиском.

За мікроскопічним аналізом у полі зору мікроскопа визначали ділянку травматичного ушкодження, що проходила через суглобовий хрящ та просякала в субхондральну кістку (рис. 12). Вона була заповнена хондроїдом, що щільно контактував із крайовими відділами суглобового хряща, прилеглою субхондральною кісткою та глибше розташованою губчастою кістковою тканиною.

Поверхня, що сформувалася над хондроїдом, мала рівні контури, складалася з тонких колагенових волокон, між якими були рідко розташовані витягнутої форми фіброхондроцити (рис. 13А). Клі-

тини мали витягнуту форму з вузькими базофільно забарвленими ядрами. Щільність клітин у хондроїді була високою. Виявлено хондробласти, які відрізнялися від фіброхондроцитів округлими або овальними ядрами, що мали чітко окреслені невеликі ядереця (рис. 13Б). Поодинокі хондроцити були оточені капсулою.

Новоутворена хрящова тканина у вигляді хондроїду щільно зросена з фрагментами суглобового хряща, прилеглими до ділянки травматичного ушкодження. У цій ділянці виявлені невеликі території без клітин або хондроцити, які формували ізогенні групи (рис. 14А, Б). Як поблизу ділянки травматичного ушкодження, так й на відстані від неї суглобовий хрящ зберігав характерну організацію (рис. 14А, Б). У ньому чітко визначалася поверхнева зона, що складалася із декількох шарів хондроцитів, розташованих своєю довгою віссю паралельно поверхні. Колагенові волокна щільно прилягали один до одного. Ознак їх розшарування не виявлено.

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

**Таблиця 1. Шкала гістологічної оцінки регенерації суглобового хряща в кістково-хрящовому дефекті, стану суглобового хряща та губчастої кісткової тканини навколо дефекту (модифікація шкал O'Driscoll S.W. et al. та Frenkel S.R. et al.)**

Категорія	Показники	Бали
I. Частка новоутвореного в дефекті гіалінового хряща	1. 75–100 % 2. 50–74 % 3. 25–49 % 4. 0–24 %	10 6 3 0
II. Характеристика регенерату: поверхня	1. Рівна, неперервна 2. Нерівна, щілини 3. Розволокнена	2 1 0
Структурна інтегрованість	1. Нормальна 2. Розриви, кісти 3. Виражена дезінтеграція	2 1 0
Щільність відносно суглобового хряща країв дефекту	1. 100 % 2. 51–99 % 3. До 50 %	2 1 0
Зв'язок регенерату з краями дефекту суглобового хряща	1. Повний 2. Частковий 3. Відсутній	2 1 0
Дегенеративні зміни клітинних елементів	1. Відсутні 2. Наявність дегенеративних змін та вогнищ проліферації хондроцитів 3. Виражені гіпоцелюлярність та кількість вогнищ проліферації хондроцитів	2 1 0
III. Суглобовий хрящ країв дефекту	1. Нормальний, вогнища проліферації відсутні 2. Наявність дегенеративних змін та вогнищ проліферації хондроцитів 3. Виражені гіпоцелюлярність та кількість вогнищ проліферації хрящових клітин	2 1 0
IV. Перебудова субхондральної кістки	1. Повна 2. > 50 % 3. < 50 %	2 1 0



На відстані від зони травматичного ушкодження поверхня суглобового хряща зберігала конгруентність.

Структурна організація суглобового хряща на відстані від зони дефекту була не порушена. У поверхневій зоні хондроцити мали витягнуту форму, були з характерними видовженими ядрами та довгою цитоплазмою (рис. 15).

У проміжній та глибокій зонах суглобового хряща хондроцити мали округлу форму з ядрами, виконаними пухким хроматином. В ядрах клітин були наявні 1–2 ядра. Клітини розташовувалися в капсулах.

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

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

## Обговорення

Аналіз результатів дослідження з використанням модифікованої шкали гістологічної оцінки показав, що гіаліновий хрящ був наявний тільки в регенераті дослідних тварин серії 3, у яких застосовували PRP. Істотного розшарування поверхні в цих тварин не виявлено, структурна інтегрованість була високою, щільність суглобового хряща навколо країв дефекту значно перевищувала показники контролю. Дегенеративні зміни хондроцитів переважали в контрольних тварин. Перебудова субхондральної кістки під зоною дефекту статистично відрізнялася в дослідній та контрольних групах тварин. При статистичному аналізі виявлено вірогідну різницю між дослідною та контрольними групами ( $P < 0,001$ ,  $t = 4,8$ ).

Отже, на 24 експериментальних тваринах (кролях) було відтворено травматичне остеохондральне ушкодження хряща у вигляді змодельованого повношаро-

вого кістково-хрящового дефекту. В контрольній групі тварин (серія 1) змодельовані дефекти після закінчення термінів дослідження чітко виявлялися на поверхні суглобового хряща. У тварин цієї серії (серія 1) крайові відділи суглобового хряща були з'єднані вузьким прошарком щільної сполучної тканини, а в ділянці губчастої кісткової тканини дефект був заповнений грануляційною та сполучною тканиною. В суглобовому хрящі навколо дефекту, а також у вище- та нижчерозташованих над дефектом ділянках виявлено великі території без клітин або поодинокі рідко розташовані хондроцити з пікнозом ядер. У зоні дефекту, що проходить через кісткову тканину, кісткові трабекули, що його оточували, формували великопетлясту мережу з низькою щільністю остеокитів.

В серії 2, де застосовували суто колагеново-фібринову матрицю для заповнення дефекту, на 40-ву добу в зоні травматичного ушкодження суглобового хряща, що проникав у кісткову тканину, визначали грануляційну та фіброзну тканину з високою щільністю фіброblastів, що межувала з вогнищами волокнистої хрящової тканини. В субхондральному відділі регенерат представлено кістковими трабекулами, що формували великопетлясту мережу.

У дослідній групі тварин серії 3, які отримували PRP, у термін спостереження в ділянці кістково-хрящового дефекту зафіксовано формування гіаліноподібної хрящової тканини з ознаками дегенерації хондроцитів, хондрофіброblastів та хондрофіброцитів, що щільно заповнювала кістково-хрящовий дефект.

У літературі немає даних щодо повного відновлення суглобового хряща (тобто формування структури — поверхневої, проміжної та глибокої зон у хрящу, що некальцифікується, та кальцифікованого хряща з характерним розташуванням хондроцитів). В основному в літературі є дані, які вказують на те, що без втручання в процес регенерації суглобового хряща в ділянках дефекту формується волокнистий хрящ [18].

**Таблиця 2. Гістологічна оцінка (в балах) регенерації суглобового хряща та губчастої кісткової тканини в зоні кістково-хрящового дефекта (модифікація шкал O'Driscoll S.W. et al. та Frenkel S.R. et al.)**

Категорія	Серія 1, контроль, бали	Серія 2, дослідна, бали	Серія 3, дослідна, бали
I. Частка новоутвореного в дефекті гіалінового хряща	0	0,3 ± 0,5	7,5 ± 1,8
II. Характеристика регенерату:			
Поверхня	0,4 ± 0,4	0,75 ± 0,50	1,6 ± 0,4
Структурна інтегрованість	0,5 ± 0,5	0,75 ± 0,50	1,75 ± 0,40
Щільність суглобового хряща відносно країв дефекту	0,5 ± 0,5	0,75 ± 0,50	1,6 ± 0,4
Зв'язок регенерату з краями дефекту суглобового хряща	0,4 ± 0,4	0,75 ± 0,50	1,6 ± 0,4
Дегенеративні зміни клітинних елементів	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,4	1,13 ± 0,30
III. Суглобовий хрящ навколо дефекту	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,5	0,75 ± 0,50
IV. Перебудова субхондральної кістки	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,4	1,4 ± 0,4
<b>Усього</b>	<b>0,375 ± 0,010</b>	<b>0,6 ± 0,1</b>	<b>2,2 ± 0,9</b>
<b>Порівняно з контролем</b>		<b>P &gt; 0,05</b>	<b>P &lt; 0,001</b>

У зв'язку з цим отримані дані про те, що під впливом PRP у ділянці остеохондрального дефекту формується гіаліновий або значно наближений до нього хрящовий регенерат із високим ступенем відновлення структури субхондральної кісткової тканини, ми розглядаємо як позитивний результат. З даних літератури відомо, що PRP стимулює біосинтез протеогліканів, колагену 2-го типу, сприяє хондрогенезу клітин, проліферації, диференціюванню й адгезії хондроцитів. Усе вищевказане підвищує репаративні потенції суглобового хряща [19–21], а результати, що отримані нами під час експерименту, підтверджують ефективність застосування PRP для стимуляції загоєння внутрішньосуглобових остеохондральних пошкоджень.

## Висновки

Таким чином, можна зробити висновок, що PRP забезпечує ефективну стимуляцію регенерації з формуванням гіаліноподібного хрящового регенерату, що за своїми морфометричними характеристиками наближається до суглобового гіалінового хряща.

**Етичний аспект.** Робота з тваринами виконувалася відповідно до правил Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей [14, 15], а також відповідно до Законодавства України [16]. План експериментальних досліджень був затверджений Комітетом із біоетики при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця від 01.09.2016 р.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

## Список літератури

1. Van Dijk C.N., Reilingh M.L., Zengerink M. et al. Osteochondral defects in the ankle: why painful? // *Knee Surg. Sports Traumatol Arthrosc.* — 2010. — 18. — P. 570-580. [PMC free article][PubMed]
2. Choi W.J., Park K.K., Kim B.S. et al. Osteochondral lesion of the talus: is there a critical defect size for poor outcome? // *Am. J. Sports Med.* — 2009. — 37. — P. 1974-1980. [PubMed]
3. Easley M.E., Scranton P.E. Jr. Osteochondral autologous transfer system // *Foot Ankle Clin.* — 2003. — 8. — P. 275-290. [PubMed]
4. Tol J.L., Struijs P.A., Bossuyt P.M. et al. Treatment strategies in osteochondral defects of the talar dome: a systematic review // *Foot Ankle Int.* — 2000. — 21. — P. 119-126. [PubMed]
5. Chodos M., Schon L. Osteochondral lesions of the talus: Current treatment modalities and future possibilities // *Current Opinion in Orthopaedics.* — April 2006. — Vol. 17, Is. 2. — P. 111-116.
6. Zengerink M., Struijs P.A., Tol J.L., van Dijk C.N. Treatment of osteochondral lesions of the talus: a systematic review // *Knee Surg. Sports Traumatol Arthrosc.* — 2010. — 18. — P. 238-246. doi: 10.1007/s00167-009-0942-6. [PMC free article][PubMed][Cross Ref]
7. Scranton P.E. Jr, Frey C.C., Feder K. Outcome of osteochondral autograft transplantation for type-V cystic osteochondral lesions of the talus // *J. Bone Joint Surg. Br.* — 2006. — 88. — P. 614-619. [PubMed]
8. Anders S., Goetz J., Schubert T., Grifka J., Schaumburger J. Treatment of deep articular talus lesions by matrix associated autologous chondrocyte implantation — results at five years // *Int. Orthop.* — 2012. — 36(11). — P. 2279-2285. doi: 10.1007/s00264-012-1635-1. [PMC free article][PubMed][Cross Ref]
9. Badekas T., Evangelou E. Treatment of talar osteochondral lesions using local osteochondral talar autograft mid term results // *Br. J. Sports Med.* — 2011. — 45. — e1.
10. Mei-Dan O., Carmont M.R., Laver L. et al. Platelet-rich plasma or hyaluronate in the management of osteochondral lesions of the talus // *Am. J. Sports Med.* — 2012. — 40. — P. 534-541. [PubMed]
11. Guney A., Akar M., Karaman I. et al. Clinical outcomes of platelet rich plasma (PRP) as an adjunct to microfracture surgery in osteochondral lesions of the talus // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* — 2015. — 23. — P. 2384-2389. [PubMed]
12. Use of a biological reactor and platelet-rich plasma for the construction of tissue-engineered bone to repair articular cartilage defects / Li H., Sun S., Liu H. et al. // *Exp. Ther. Med.* — 2016. — Vol. 12, № 2. — P. 711-719.
13. Yoshioka M., Coutts R.D., Amiel D., Hacer S.F. Characterisation of a model of osteoarthritis in the rabbit knee // *Osteoarthr. Cartilage.* — 1996. — № 4. — P. 87-98.
14. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. — Strasbourg. 18. III. — 1986. — № 123. — 52 p.
15. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу до документа: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
16. Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (стаття 26).
17. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гуляров. — СПб.: СпецЛит, 2010. — 95 с.
18. Остеоартроз: консервативная терапия: монография / Н.А. Корж, А.Н. Хвсюк, Н.В. Дедух и др.; Под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. — Харьков: Золотые страницы, 2007. — 424 с.
19. Articular cartilage defects reconstruction by plasma rich growth factors/ Cugat R., Carrillo J.M., Serra I. et al. // Zannasi S., Brittberg M., Maracci M. eds. *Basic Science, Clinical Repair and Reconstruction of Articular Cartilage Defects: Current Status and Prospects.* — Bologna, Italy: Timeo Editore, 2006. — P. 801-807.
20. Gobbi A. Biological Approaches for Cartilage Repair / A. Gobbi, L. Bathan // *J. Knee Surg.* — 2009. — Vol. 22. — № 1. — P. 36-44.
21. Use of a biological reactor and platelet-rich plasma for the construction of tissue-engineered bone to repair articular cartilage defects / Li H., Sun S., Liu H. et al. // *Exp. Ther. Med.* — 2016. — Vol. 12, № 2. — P. 711-719.

Отримано 15.01.2019 ■

Бурьянов О.А.<sup>1</sup>, Лябах А.П.<sup>3</sup>, Дедух Н.В.<sup>2</sup>, Омельченко Т.М.<sup>1</sup>, Черновол П.А.<sup>1</sup>, Турчин О.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца МЗ Украины, г. Киев, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов имени проф. Н.И. Ситенко НАМН Украины», г. Харьков, Украина

<sup>3</sup>ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», г. Киев, Украина

### Применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, при лечении остеохондральных дефектов в эксперименте на животных

**Резюме. Актуальность.** Применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP —platelet rich plasma), является перспективной и весьма популярной методикой, используемой с целью улучшения регенерации пораженных тканей опорно-двигательного аппарата. Однако недостаточная доказательная база обуславливает необходимость проведения исследований по изучению эффективности данного метода лечения. **Цель исследования:** в эксперименте на 24 животных (кролики) путем морфологических исследований и морфометрического анализа оценить эффективность применения PRP при лечении внутрисуставных остеохондральных повреждений и дефектов. **Материалы и методы.** Морфометрический анализ препаратов, полученных от 24 экспериментальных животных, которые были разделены на три группы (2 контрольные и 1 опытная), проводили для определения характера и структуры регенерата, его интеграции в окружающих тканях, оценки содержания клеточных структур и неклеточных элементов, сформировавшихся в дефекте в различных сериях эксперимента, с использованием модифицированной шкалы S.W. O'Driscoll et al. и S.R. Frenkel et al. **Результаты.** Анализ результатов иссле-

дования с использованием модифицированной шкалы гистологической оценки показал, что гиалиновый хрящ присутствовал только в регенерате опытных животных серии 3, у которых применяли PRP. Существенного расслоения поверхности хряща у этих животных не выявлено, структурная интегрированность была высокой, плотность суставного хряща вокруг краев дефекта значительно превышала показатели контроля. Дегенеративные изменения хондроцитов преобладали у контрольных животных. Перестройка субхондральной кости под зоной дефекта статистически отличалась в исследуемой и контрольных группах животных. При статистическом анализе выявлена достоверная разница между исследуемой и контрольными группами ( $P < 0,001$ ,  $t = 4,8$ ), что свидетельствует об эффективности применения PRP. **Выводы.** Результаты работы подтвердили эффективность применения PRP для лечения пациентов с внутрисуставными остеохондральными повреждениями и дефектами.

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

О.А. Burianov<sup>1</sup>, А.Р. Lyabakh<sup>3</sup>, N. V. Dedukh<sup>2</sup>, T.M. Omelchenko<sup>1</sup>, P.A. Chernovol<sup>1</sup>, O.A. Turchin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>SI "Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the NAMS of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>SI "Institute of Traumatology and Orthopedics of the NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

### Application of platelet-rich plasma in the treatment of osteochondral defects in animal testing

**Abstract. Background.** The use of platelet-rich plasma (PRP) is a promising and very popular technique to improve the regeneration of the affected tissues of the musculoskeletal system. However, insufficient evidence base necessitates conducting researches to study the effectiveness of this treatment method. Purpose to assess the effectiveness of PRP in the treatment of intra-articular osteochondral injuries and defects in an experiment on 24 animals (rabbits) by morphological studies and morphometric analysis. **Materials and methods.** Morphometric analysis of preparations obtained from 24 experimental animals, which were divided into three groups (2 control and 1 experimental), was carried out to determine the nature and structure of the regenerate, its integration into the surrounding tissues, to assess the content of cellular structures and non-cellular elements formed in the defect in various series of experiment. A modified scale of S.W. O'Driscoll et al. and S.R. Frenkel et al. was used. **Results.** Analysis of study results using a modified scale of histological evalu-

ation showed that hyaline cartilage was present only in the regenerate of experimental animals of series No. 3, in which PRP was used. Significant delamination of the cartilage surface was not detected in these animals, structural integration was high, the density of articular cartilage around the edges of the defect significantly exceeded the control values. Degenerative changes in chondrocytes prevailed in control animals. The rearrangement of the subchondral bone under the defect area was statistically different in the studied and control animals. The statistical analysis revealed a significant difference between the studied and control groups ( $P < 0.001$ ,  $t = 4.8$ ), which indicates the effectiveness of PRP. **Conclusions.** The results of the study confirmed the effectiveness of PRP for the treatment of patients with intra-articular osteochondral lesions and defects.

**Keywords:** osteochondral defects; cartilage regeneration; regenerative technologies; platelet-rich plasma; bone marrow-derived cell transplantation