

ДОНОРСТВО И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ORGAN AND TISSUE DONATION AND TRANSPLANTATION

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ
<https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.2.TX.1>

ORIGINAL ARTICLE
УДК 617-089.844:615.36:611-013.85-032

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНТЕГРАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ И АЛЛОГЕННЫХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ СУХОЖИЛИЙ В КАНАЛЕ БЕДРЕННОЙ КОСТИ НА МОДЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.А. Будаев¹, Н.С. Тропская^{1,2}, Н.В. Боровкова^{1,3}, А.М. Файн^{1,4}, Г.П. Титова¹, М.С. Макаров¹, А.Ю. Ваза¹,
И.Н. Пономарев¹, Е.А. Кислякова¹, О.С. Кислицына¹, А.А. Офицеров¹, Д.А. Кисель¹,
М.В. Сторожева¹, В.В. Сластиин⁵, А.А. Каниболоцкий¹

¹Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, г. Москва, 129090, Россия

²Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет), Волоколамское шоссе, д. 4, г. Москва, 125080, Россия

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова д. 1, г. Москва, 117997, Россия

⁴Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, ул. Делегатская, 20, стр. 1, 127473, г. Москва, Россия

⁵Городская клиническая больница им. С.С. Юдина, Коломенский пр., д. 4, г. Москва, 115446, Россия

Резюме. *Актуальность.* Трансплантаты на основе аллогенных сухожилий являются востребованными при проведении пластики связок коленного сустава. В НИИ СП им. Н.В. Склифосовского разработан способ криоконсервирования аллогенных сухожилий, включающий стерилизацию сверхкритическим диоксидом углерода. Доказано, что криоконсервированные сухожилия сохраняют нормальную структуру волокон без значительной потери механических свойств. Для последующего клинического применения важной является оценка интеграции криоконсервированных аллогенных сухожилий внутри костного канала на модели экспериментальных животных. *Цель исследования:* провести сравнительный анализ изменения морфологии аутологичных и аллогенных сухожилий в канале бедренной кости у крыс и определить влияние трансплантации сухожилия на физическую активность животных. *Материал и методы.* Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах. Сформировано три группы животных: контрольная (животные без трансплантации сухожилия), 1-я опытная группа – животные с трансплантацией аутологичного сухожилия, 2-я опытная группа – животные с трансплантацией аллогенного сухожилия. У животных опытных групп формировали сквозной канал в дистальном метаэпифизе бедренной кости и помещали туда трансплантат сухожилия хвоста размером 0,5×0,1 см. Для оценки физической активности животных использовали тредмил-тест и определяли максимальную дистанцию, которую животные могли пробежать через 3 и 6 недель после трансплантации. Структуру трансплантатов оценивали на гистологических препаратах в проходящем свете, окрашенных гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Для оценки сохранности коллагеновых волокон определяли интенсивность автофлуоресценции коллагена. *Результаты.* По данным тредмил-теста, дистанция, пробегаемая животными обеих опытных групп, достоверно не отличалась от значений в контрольной группе. При гистологическом анализе через 3 недели в обеих опытных группах в структуре трансплантата обнаружены признаки декомпактизации волокон при отсутствии воспалительной инфильтрации и сохранении тесного контакта с трабекулами кости. Интенсивность автофлуоресценции коллагеновых волокон была близкой к норме. Через 6 недель у животных обеих опытных групп выявляли участки сращения трансплантата с собственной костью, активно формировались шарпеевские волокна. В обеих группах в зоне контакта сухожилий с костью визуализировали многочисленные мелкие сосуды диаметром до 10 мкм. Инфильтрация трансплантатов клетками воспаления отсутствовала или была очень незначительной, активной миграции фибробластов в область сухожилия также не наблюдали. В опытных группах трансплантаты сухожилий имели зоны декомпактизации волокон. В зоне контакта с костью автофлуоресценция волокон сухожилий была резко увеличена, что говорит о химическом расщеплении коллагена. Через 3 и 6 недель после трансплантации в обеих опытных группах наблюдали эффект фиксации (интеграции) сухожилия с костной тканью. *Выводы.* Трансплантаты аллогенных сухожилий не вызывали выраженной воспалительной или иммунной реакции у экспериментальных животных. Через 6 недель после трансплантации аутологичных и аллогенных сухожилий имелась интеграция трансплантатов внутри канала бедренной кости. Аллогенные сухожилия, консервированные по предложенной методике, способны интегрироваться в ткани реципиента без выраженных структурно-функциональных нарушений. По данным тредмил-теста, дистанция, пробегаемая животными обеих опытных групп, статистически значимо не отличалась от значений в контрольной группе (без трансплантации сухожилия) через 3 и 6 недель.

Ключевые слова: трансплантаты сухожилий, тредмил-тест, коллагеновые волокна, автофлуоресценция, интеграция.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Соответствие нормам этики. Авторы подтверждают, что соблюдены правила обращения с животными при их использовании в биомедицинских исследованиях.

Для цитирования: Будаев А.А., Тропская Н.С., Боровкова Н.В., Файн А.М., Титова Г.П., Макаров М.С., Ваза А.Ю., Пономарев И.Н., Кислякова Е.А., Кислицына О.С., Офицеров А.А., Сторожева М.В., Сластиин В.В., Каниболоцкий А.А., Кисель Д.А. Сравнительный анализ интеграции аутологичных и аллогенных криоконсервированных сухожилий в канале бедренной кости на модели лабораторных животных. *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье.* 2024;14(2):131-139. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.2.TX.1>

© Будаев А.А., Тропская Н.С., Боровкова Н.В., Файн А.М., Титова Г.П., Макаров М.С., Ваза А.Ю., Пономарев И.Н., Кислякова Е.А., Кислицына О.С., Офицеров А.А., Сторожева М.В., Сластиин В.В., Каниболоцкий А.А., Кисель Д.А., 2024

✉ Будаев Антон Аркадьевич, BudaevAA@sklif.mos.ru



COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INTEGRATION OF AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC CRYOPRESERVED TENDONS IN THE FEMORAL CANAL ON A MODEL OF LABORATORY ANIMALS

Anton A. Budaev¹, Nataliya S. Tropkaya^{1,2}, Natal'ya V. Borovkova^{1,3}, Aleksey M. Fayn^{1,4}, Galina P. Titova¹, Maksim S. Makarov¹, Aleksandr Yu. Vaza¹, Ivan N. Ponomarev¹, Ekaterina A. Kislyakova¹, Oksana S. Kislitsyna¹, Andrey A. Ofitserov¹, Dmitriy A. Kisel'¹, Maya V. Storozheva¹, Vladimir V. Slastinin⁵, Aleksandr A. Kanibolotskiy¹

¹N.V. Sklifosovsky Scientific Research Institute of Emergency Medicine, 3, Bolshaya Sukharevskaya pl., Moscow, 129090, Russia

²Moscow Aviation Institute (National Research University), 4, Volokolamsk Highway, Moscow, 125080, Russia

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

⁴A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20, building 1, Delegatskaya str., 127473, Moscow, Russia

⁵S.S. Yudin City Clinical Hospital, Kolomenskiy ave., 4, Moscow, 115446, Russia

Abstract. Allogeneic tendon grafts are seriously demand in knee joint plastic surgery. The novel method of tendon cryopreservation, including sterilization with supercritical carbon dioxide, was developed in N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Cryopreserved tendons retain their normal fiber structure without significant loss of mechanical properties. At the next stage it was necessary to evaluate cryopreserved tendons' integration inside bone canal in experimental animals. *The aim of study.* To evaluate morphologic changes of autologous and allogeneic tendons inside the femur in rats and to determine the effect of tendon transplantation on the physical activity. *Material and methods.* The study was conducted on white inbreed male rats. Three groups of animals were formed: the control group (animals without tendon transplantation), the 1st experimental group - animals with autologous tendon transplantation, the 2nd experimental group - animals with allogeneic tendon transplantation. In animals of the experimental groups the through channel was formed in the distal metaepiphysis of the femur and a tail tendon graft 0.5 x 0.1 cm was placed there. To assess the physical activity of the animals, we studied maximum distance that the animals could run 3 and 6 weeks after transplantation was determined, using treadmill test. The graft structure was evaluated on histological preparations in transmitted light, stained with hematoxylin-eosin and Van Gieson's stain. To assess the preservation of collagen fibers we checked the autofluorescence intensity of collagen. *Results.* According to the treadmill test, the distance run by the animals of both experimental groups did not significantly differ from the values in the control group. Histological analysis after 3 weeks in both experimental groups revealed signs of fibers' decomposition in the absence of inflammatory infiltration and maintaining close contact with bone trabeculae. The autofluorescence intensity of the collagen fibers in grafts corresponded to normal or was close to normal. After 6 weeks, the animals of both experimental groups revealed areas of graft fusion with their own bone, Sharpe fibers were actively formed. In both groups, numerous small vessels with diameters up to 10 microns were detected in the area of tendon-bone contact. Infiltration of grafts by inflammatory cells was absent or very insignificant, active migration of fibroblasts to the tendon area was also not observed. In both groups, tendon grafts had areas where fiber decompactization was observed. In the area of contact with the bone, the autofluorescence of tendon fibers was sharply increased, which indicates the chemical cleavage of collagen. At 3 and 6 weeks after transplantation the effect of fixation (integration) of the tendon with bone tissue was observed in both experimental groups. *Conclusions.* Allogeneic tendon grafts did not cause a pronounced inflammatory or immune reaction in experimental animals. 6 weeks after transplantation of autologous and allogeneic tendons, the integration of grafts inside the femoral canal was observed. Cryopreserved allogeneic tendons were able to integrate into the body's own tissues without pronounced structural and functional disorders. According to the treadmill test, the distance covered by the animals of both experimental groups did not differ statistically significantly from the values in the control group (without tendon transplantation) after 3 and 6 weeks.

Key words: tendon grafts, treadmill-test, collagen fibers, autofluorescence, integration.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. This research received no external funding.

Compliance with ethical principles. The authors confirm that the rules for the treatment of animals are observed when they are used in biomedical research.

Cite as: Budaev A.A., Tropkaya N.S., Borovkova N.V., Fayn A.M., Titova G.P., Makarov M.S., Vaza A.Yu., Ponomarev I.N., Kislyakova E.A., Kislitsyna O.S., Ofitserov A.A., Storozheva M.V., Slastinin V.V., Kanibolotskiy A.A., Kisel' D.A. Comparative analysis of the integration of autologous and allogeneic cryopreserved tendons in the femoral canal on a model of laboratory animals. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ". Rehabilitation, Doctor and Health.* 2024;14(2):131-139. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.2.TX.1>

Актуальность

Артроскопическая пластика связок коленного сустава является одной из самых часто выполняемых операций в России за последние 5 лет [1]. Это направление также является актуальным в общемировой практике [2-4]. В качестве пластического материала, как правило, используют собственные (аутологичные) ткани [3, 4]. В то же время перспективным направлением является использование аллогенных трансплантатов, которое позволяет избежать дополнительной травматизации пациента и сокращает время хирургического вмешательства. Ограничения к широкому использованию аллогенных сухожилий для пластики обусловлены отсут-

ствием стандартных методик их консервирования и стерилизации [1-7]. Применяемый в некоторых банках тканей метод консервации, основанный на децеллюляризации сухожилий с последующей лиофилизацией и стерилизацией гамма лучами, нарушает нативную организацию межклеточного матрикса сухожилий, в первую очередь, гликозаминогликанов и эластиновых волокон. Это приводит к снижению механических характеристик и функциональных параметров трансплантатов [5-8]. В связи с этим актуальным является выбор эффективного способа консервирования трансплантатов сухожилий. На базах ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» и ФГБУН ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН предло-

жен способ стерилизации сухожилий, который включает обработку сухожилий криоконсервантом, стерилизацию сверхкритическим диоксидом углерода в криопакете с последующим хранением при -80°C [9]. Показано, что консервированные таким образом трансплантаты сохраняли структуру волокон без значительной потери механических свойств [10]. На следующем этапе необходимо оценить изменение структуры консервированных аллогенных сухожилий в костном канале на модели *in vivo*. Интеграция ткани сухожилий включает процессы перестройки коллагеновых волокон, реваскуляризации и ревитализации матрикса, внедрение коллагеновых волокон в кость [11]. Также было важно оценить двигательную активность у животных с трансплантатами сухожилий. Исследование этих процессов является очень важным для разработки трансплантатов аллогенных сухожилий с высокой клинической эффективностью.

Цель работы: провести сравнительный анализ изменения морфологии аутологичных и аллогенных сухожилий в канале бедренной кости у крыс и определить влияние трансплантации сухожилия на физическую активность животных.

Материал и методы

При выполнении исследования были соблюдены требования приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию ор-

ганизационных форм работы с использованием экспериментальных животных», приложения к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Федерального закона, принятого Государственной Думой 01.12.1999 г., «О защите животных от жестокого обращения». Содержание экспериментальных животных и уход за ними в условиях вивария были стандартными и соответствовали требованиям Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными.

Также было получено разрешение комитета по биомедицинской этике Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» протокол № 2-23 от 28.03.2023 г.

Исследование проводили на 25 белых беспородных крысах-самцах, массой тела от 250 до 300 г. Сформировано три группы животных: контрольная (животные без трансплантации сухожилия, $n = 5$), и две опытные группы: 1 группа - животные с трансплантацией аутологичного сухожилия ($n = 10$), 2 группа - животные с трансплантацией аллогенного сухожилия ($n = 10$). У животных опытных групп формировали сквозной канал в дистальном метаэпифизе бедренной кости и помещали туда трансплантат сухожилия хвоста размером $0,5 \times 0,1$ см (рис. 1).

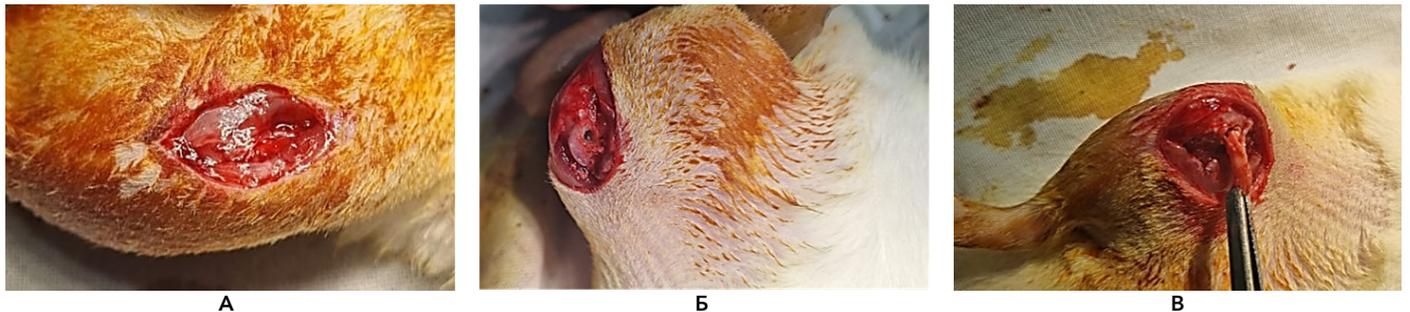


Рисунок 1. Этапы операции: А - хирургический доступ, Б - формирование сквозного канала, В - установка трансплантата
Figure 1. The stages of the operation: A - surgical access, B - formation of a through channel, V - graft installation



Рисунок 2. Эксплантация аутологичного сухожилия хвоста крысы
Figure 2. Explantation of an autologous rat tail tendon

В первой опытной группе (10 животных) в канал помещали фрагмент аутологичного сухожилия хвоста, забранного непосредственно перед трансплантацией (рис. 2). Во второй опытной группе (10 животных) трансплантировали аллогенные сухожилия, заготовленные заранее (рис. 3).

До трансплантации аллогенные сухожилия стерилизовали сверхкритическим диоксидом углерода с медленной декомпрессией газа, и хранили при температуре -80°C с криоконсервантом (10 % диметилсульфоксид). Размораживали аллогенные трансплантаты непосредственно перед экспериментом при $+4^{\circ}\text{C}$ и отмывали физиологическим

0,9 % раствором хлорида натрия в течении 10 минут. Выведение животных осуществляли через 3 и 6 недель после операции по 5 крыс в каждой опытной группе. Перед выведением животных из эксперимента оценивали визуально и пальпаторно болезненность донорской зоны, заживление послеоперационных ран. Гистологические препараты области трансплантации сухожилия готовили по стандартной методике с окрасками гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Для оценки сохранности коллагеновых волокон определяли интенсивность автофлуоресценции коллагена, MFI (фут-кандел) [12].

Для оценки физической активности животных использовали установку Treadmill Panlab (Harvard Apparatus, США) (рис. 4). В ходе тестирования применили протокол с постепенным наращиванием скорости вращения ленты тредмила - каждые 30 сек на 5 м/мин до достижения скорости 40 м/мин [13, 14]. Стимуляцию в виде электроимпульса постоянного тока проводили с силой тока 1,2 А при касании животным края платформы. Во всех группах число стимуляций составляло от 30 до 60. В ходе тестирования оценивали дистанцию, которую пробежало животное за время тестирования (м). Точкой окончания теста для каждого животного была невозможность продолжать бег.

Для статистической обработки вычисляли медиану (Me), 1-й и 3-й квартили (25 %; 75 %). Для сравнения количественных данных использовали U-критерий Манна - Уитни для независимых переменных. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В послеоперационном периоде при физикальном исследовании крыс было отмечено, что наличие донорской раны на хвосте у крыс 2-й опытной группы негативно сказывалось на их подвижности (крысы щадили хвост, он не помогал держать равновесие при движениях) на обоих сроках наблюдения.

По данным тредмил-теста, дистанция, пробегаемая животными обеих опытных групп, статистически значимо не отличалась от значений в контрольной группе (без трансплантации сухожилия) через 3 и 6 недель (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ физической активности животных
Table 1. Comparative analysis of physical activity of animals

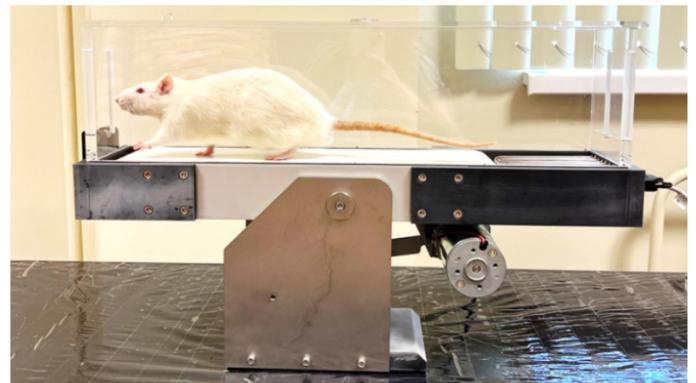
Группы		Средняя дистанция, пробегаемая животными, м Me (25; 75) %	р-критерий
Контроль (интактные животные)		49 (19; 69)	-
Животные с аутологичным трансплантатом	3 недели	59 (22; 158)	$p_1 = 0,54$
	6 недель	39 (24; 64)	$p_1 = 0,12$
Животные с аллогенным трансплантатом	3 недели	48 (28; 108)	$p_1 = 0,79$
	6 недель	56 (53; 98)	$p_2 = 0,92$
			$p_1 = 0,35$
			$p_2 = 0,14$

Примечание: p_1 - относительно контроля; p_2 - относительно группы с аутологичным трансплантатом.

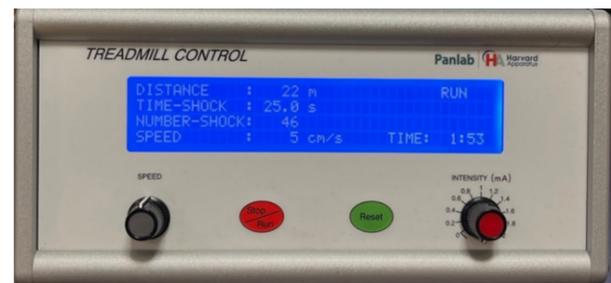


Рисунок 3. Упакованные и простерилизованные образцы аллогенных сухожилий крысы

Figure 3. Packaged and sterilized samples of rat allogeneic tendons



А



Б

Рисунок 4. Установка для оценки физической активности животных: закрытая куполом беговая дорожка (А) и блок управления (Б)

Figure 4. Installation for assessing the physical activity of animals: a dome-enclosed treadmill (A) and a control unit (B)

Таким образом, результаты тредмил-теста у животных всех трёх сравниваемых групп существенно не изменялись и соответствовали нормальным значениям, приводимым в литературных источниках [14].

При гистологическом анализе через 3 недели в обеих опытных группах на препаратах в проходящем свете и при автофлуоресценции коллагена подтверждена локализация трансплантата сухожилия в костном канале. Гистологически в структуре ауто трансплантата обнаружены признаки разобщения пучков коллагена в центре с разволокнением коллагеновых волокон по периферии в зоне контакта с костью и снижением их фуксинофилии (рис. 5).

В структуре части аллотрансплантата в отдельных участках терялась регулярная ориентация коллагеновых волокон, резко снижалась фуксинофилия при сохранении тесного контакта сухожилий с трабекулами кости (рис. 6).

При этом в обеих группах инфильтрация клетками воспаления отсутствовала или была слабо выраженной. Оценка автофлуоресценции показала, что коллагеновые волокна сохраняли параллельную ориентацию (рис. 7). Средняя интенсивность автофлуоресценции (MFI) коллагеновых волокон транс-

плантата соответствовала норме или была близкой к норме (32–37 фут-кандел).

Через 6 недель у животных обеих опытных групп гистологически выявлены участки сращения трансплантата с собственной костью. Заметно увеличилось обнаружение крупных интенсивно фуксинофильных пучков коллагена (шарпеевских волокон) вблизи места введения трансплантата в костную ткань (рис. 8).

В обеих группах в зоне контакта сухожилий с костью отмечены многочисленные мелкие сосуды диаметров до 10 мкм. При этом инфильтрация трансплантатов клетками воспаления отсутствовала или была очень незначительной, миграция фибробластов в область сухожилия также не выявлена. В обеих группах трансплантаты сухожилий имели зоны, где наблюдали диффузное разволокнение пучков коллагена на четко контурирующиеся волокна с сохранением их фуксинофилии, с отсутствием капсулы от костной ткани и вращением трабекул губчатой кости в сухожилии (эффект ремоделирования) (рис. 9).

Подобные изменения наблюдали и в аллотрансплантатах, отличавшиеся интенсивной васкуляризацией сухожилия вне контакта с костью (рис. 10, А, Б).

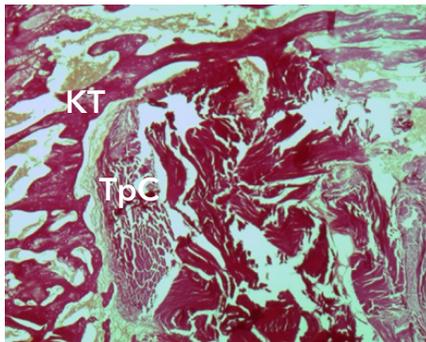


Рисунок 5. Морфологические изменения ауто трансплантата через 3 недели после трансплантации: краевое разобщение коллагеновых волокон. Окраска по Ван-Гизону. Ув.×34. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, TrC - трансплантат сухожилия

Figure 5. Morphological changes in the autograft 3 weeks after transplantation: marginal separation of collagen fibers. Van Gieson staining. Magn.×34. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft

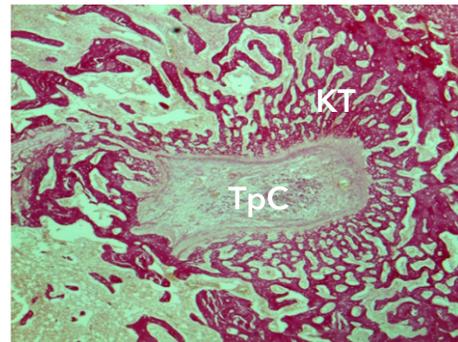


Рисунок 6. Морфологические изменения аллотрансплантата через 3 недели после трансплантации: зона фрагментации и снижения фуксинофилии коллагеновых волокон. Окраска по Ван-Гизону. Ув.×34. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, TrC - трансплантат сухожилия

Figure 6. Morphological changes in the allograft 3 weeks after transplantation: zone of fragmentation and decreased fuchsinophilia of collagen fibers. Van Gieson staining. Magn. .×34. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft

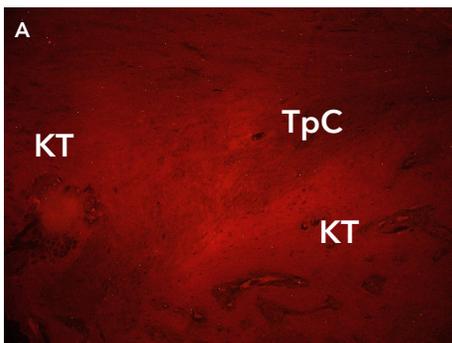
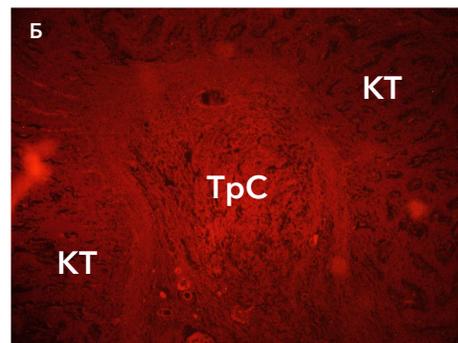


Рисунок 7. Автофлуоресценция коллагеновых волокон в составе ауто трансплантата (А) и аллотрансплантата (Б) через 3 недель после трансплантации. Ув.× 100. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, TrC - трансплантат сухожилия

Figure 7. Autofluorescence of collagen fibers in the autograft (А) and allograft (Б) 3 weeks after transplantation. Magn. × 100. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft



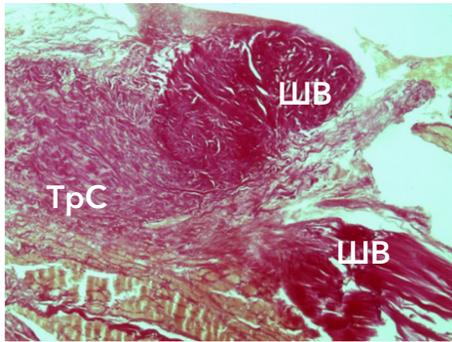


Рисунок 8. Формирование крупных коллагеновых волокон (шарпеевские волокна) в области контакта аутографта с костью. Окраска по Ван-Гизону. Ув.×34. Условные обозначения: ШВ - шарпеевские волокна, ТрС - трансплантат сухожилия
Figure 8. Formation of large collagen fibers (Sharpey's fibers) in the area of contact of the autograft with the bone. Van Gieson staining. Magn.×34. Legend: SHV - Sharpey fibers, TrS - tendon graft

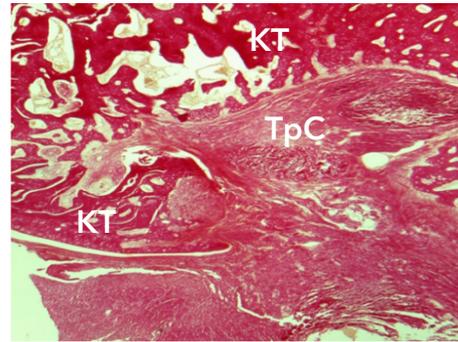


Рисунок 9. Морфологические изменения аутографта через 6 недель после трансплантации. Окраска по Ван-Гизону. Ув.×34. Наблюдается разобщение пучков коллагеновых волокон и тесный контакт с трабекулами кости. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, ТрС - трансплантат сухожилия
Figure 9. Morphological changes in the autograft 6 weeks after transplantation. Van Gieson staining. Magn.×34. There is separation of the collagen fiber bundles and close contact with the bone trabeculae. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft

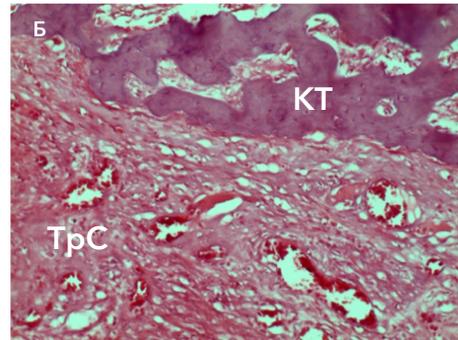
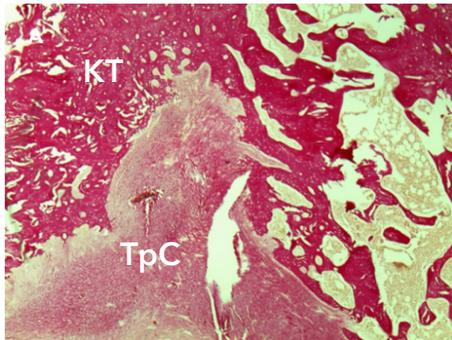


Рисунок 10. Морфологические изменения аллотрансплантата через 6 недель после трансплантации: А - разобщение пучков коллагеновых волокон и тесный контакт трансплантата с трабекулами кости, окраска по Ван-Гизону, ув.×34; Б - васкуляризация трансплантата сухожилия, окраска гематоксилином и эозином, ув.×100. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, ТрС - трансплантат сухожилия
Figure 10. Morphological changes in the allograft 6 weeks after transplantation: A - separation of collagen fiber bundles and close contact of the graft with bone trabeculae, Van Gieson staining, magnification ×34; B - vascularization of the tendon graft, staining with hematoxylin and eosin, Magn. × 100. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft

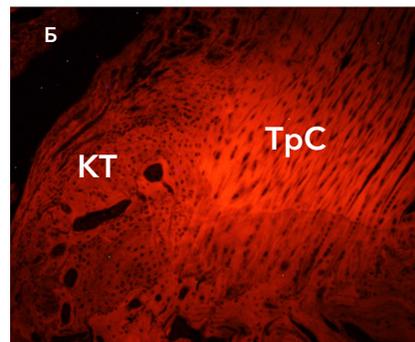
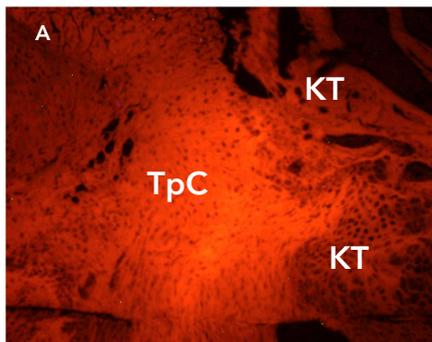


Рисунок 11. Автофлуоресценция коллагеновых волокон в составе аутографта (А) и аллотрансплантата (Б) через 6 недель после трансплантации. Ув.×100. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, ТрС - трансплантат сухожилия
Figure 11. Autofluorescence of collagen fibers in the autograft (A) and allograft (B) 6 weeks after transplantation. Magn. ×100. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft

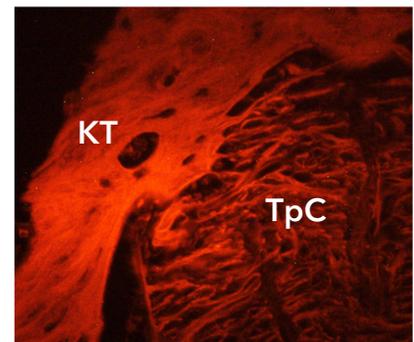


Рисунок 12. Декомпактизация и химическая деформация волокон аллотрансплантата через 6 недель после трансплантации. Автофлуоресценция коллагена. Ув.×400. Условные обозначения: КТ - костные трабекулы, ТрС - трансплантат сухожилия
Figure 12. Decomposition and chemical deformation of allograft fibers 6 weeks after transplantation. Auto-fluorescence of collagen. Magn. ×400. Legend: CT - bone trabeculae, TrS - tendon graft

В зоне тесного контакта трансплантатов сухожилий с костью значение MFI собственных коллагеновых волокон сухожилий было заметно увеличено и превышало 50–60 фут-кандел, что говорит о химическом расщеплении коллагена (рис. 11, А, Б).

В структуре сухожилий выявлены многочисленные участки, где MFI коллагеновых волокон снижался до 15–20 фут-кандел. Снижение MFI указывает на декомпактизацию волокон, которая может быть вызвана перестройкой сухожилия. У животных с аллогенными трансплантатами уровень MFI был неравномерным по всей длине волокон, выявлены области со сниженным MFI, а также короткие фрагменты отдельных волокон с яркостью более 60 фут-кандел (рис. 12).

Таким образом, на основании гистологического и гистохимического (окраска по Ван-Гизону) изучения экспериментального материала ауто- и аллотрансплантата сухожилия через 3 и 6 недель после операции независимости от разной степени выраженности дегградации коллагена был достигнут эффект фиксации (интеграции) сухожилия с костной тканью, растающей в сухожилие.

Обсуждение

По данным литературы, процесс ремоделирования сухожилий, трансплантированных в костный канал, начинается через 4 недели с момента операции [6–8]. Этот процесс включает активную миграцию клеток, в т.ч. мультипотентных, активный рост сосудов. Большую роль в процессе ремоделирования играют факторы роста и цитокины. Их источником могут быть разные клетки: фибробласты, остеобласты, мультипотентные клетки, эндотелиоциты, макрофаги [11]. В проведенном исследовании нам не удалось выявить выраженную миграцию клеток через 6 недель с момента трансплантации. С другой стороны, на гистологических препаратах отчетливо выявлялись шарпеевские волокна и многочисленные новообразованные сосуды, которые можно было видеть, как в проходящем свете, так и при регистрации автофлуоресценции коллагена. Примечательно, что в зоне роста сосудов коллагеновые волокна были подвержены химическому расщепле-

нию, что выражалось в значительном увеличении MFI таких волокон. Аллогенные сухожилия не стимулировали развитие иммунологической или воспалительной реакции. Считается, что иммуногенность трансплантатов в значительной степени тормозит их ремоделирование [11]. В нашем исследовании мы не наблюдали инфильтрации области аллогенных криоконсервированных сухожилий лимфоцитами, что указывает на их низкую иммуногенность. Рост шарпеевских волокон является нормальным процессом регенерации кости [7]. Аутологичные и аллогенные трансплантаты не препятствовали восстановлению кости у исследуемых животных. Анализ двигательной активности по результатам тредмил-теста показал, что двигательная активность через 6 недель после операции полностью восстанавливалась. Значимой разницы между исследуемыми группами не выявлено. Таким образом, реабилитационный период после трансплантации аллогенных сухожилий требовал столько же времени, как и после использования аутологичных трансплантатов.

Выводы

Трансплантаты аллогенных сухожилий, помещенные в канал дистального метаэпифиза бедренной кости, не вызывали выраженной воспалительной или иммунной реакции у экспериментальных животных. Через 6 недель после трансплантации аутологичных и аллогенных сухожилий наблюдалась интеграция трансплантатов внутри канала бедренной кости. В области интеграции аутологичных и аллогенных сухожилий наблюдался рост сосудов. Через 6 недель у экспериментальных животных обеих групп отмечен ранний этап ремоделирования трансплантатов сухожилий на фоне сохранения двигательной активности животных. Аллогенные сухожилия, консервированные по предложенной методике, способны интегрироваться в ткани реципиента без выраженных структурно-функциональных нарушений. Оценка двигательной активности показала, что наличие трансплантата сухожилий в костном канале значимо не влияла на двигательную активность животных.

Литература [References]

- 1 Пупынин Д.Ю., Лычагин А.В., Грицюк А.А. Результаты применения динамической внутрисвязочной стабилизации при разрыве передней крестообразной связки. *Кафедра травматологии и ортопедии*. 2022;4(50):45-51. Pupyinin D.Y., Lychagin A.V., Gritsyuk A.A., The results of the application of dynamic intraligamentous stabilization in case of rupture of the anterior cruciate ligament. *Department of Traumatology and Orthopedics*. 2022;4:45-51. (In Russ). <https://doi.org/10.17238/2226-2016-2022-4-45-51>
- 2 Dai W, Leng X, Wang J, Cheng J, Hu X, Ao Y. Quadriceps Tendon Autograft Versus Bone-Patellar Tendon-Bone and Hamstring Tendon Autografts for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Sports Med*. 2022;50(12):3425-3439. <https://doi.org/10.1177/03635465211030259>
- 3 Rousseau R, Labryere C, Kajetanek C., Deschamps O., Makridis K.G., Djian P. Complications After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction and Their Relation to the Type of Graft: A Prospective Study of 958 Cases. *Am. J. Sports Med*. 2019;47:2543-2549. <https://doi.org/10.1177/0363546519867913>
- 4 Runer A, Csapo R, Hepperger C, Herbolt M, Hoser C, Fink C. Anterior Cruciate Ligament Reconstructions With Quadriceps Tendon Autograft Result in Lower Graft Rupture Rates but Similar Patient-Reported Outcomes as Compared With Hamstring Tendon Autograft: A Comparison of 875 Patients. *Am J Sports Med*. 2020;48(9):2195-2204. <https://doi.org/10.1177/0363546520931829>

- 5 Шангина О.Р., Булгакова Л.А. Структурные особенности лиофилизированных тканей и возможности их клинического применения. *Практическая медицина*. 2019;17(1):20-23. Shangina O.R., Bulgakova L.A. Structural peculiarities of lyophilized tissues and possibilities of their clinical application. *Practicheskaya Medicina*. 2019;17(1):20-23. (In Russ).
- 6 Scheffler S.U., Unterhauser F.N., Weiler A. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16:834-842. <https://doi.org/10.1007/s00167-008-0560-8>
- 7 Edwards J.H., Jones G.L., Herbert A., Fisher J., Ingham E. Integration and functional performance of a decellularised porcine superflexor tendon graft in an ovine model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Biomaterials*. 2021;279:121204. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121204>
- 8 Yun H.W., Jin Y.J., Shin D.I., Noh S., Kim K.M., Park J.Y., Lim S., Park D.Y. Fibrocartilage extracellular matrix augmented demineralized bone matrix graft repairs tendon-to-bone interface in a rabbit tendon reconstruction model. *Biomater Adv*. 2023;152:213522. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213522>
- 9 Будаев А.А., Николаев А.Ю., Хохлов А.Р., Боровкова Н.В., Бондарев В.Б., Файн А.М., Черненко Т.В., Макаров М.С., Ваза А.Ю., Андреев Ю.В., Сторожева М.В. Способ и установка для стерилизации трансплантатов сухожилий. Патент на изобретение RU 2802139 С1, 22.08.2023. Заявка № 2022128646 от 04.11.2022. Budaev A.A., Nikolaev A.Yu., Khohlov A.R., Borovkova N.V., Bondarev V.B., Fain A.M., Chernen'kaya T.V., Makarov M.S., Vaza A.Yu., Andreev Yu.V., Storozheva M.V. Method and construction for tendon graft sterilization. RF patent 2802139 C1, 22.08.2023. (In Russ).
- 10 Будаев А.А., Боровкова Н.В., Файн А.М., Николаев А.Ю., Макаров М.С., Сторожева М.В., Скуратовская К.И., Ваза А.Ю., Фомичева И.В., Черненко Т.В., Каниболоцкий А.А. Оценка эффективности стерилизации аллогенных трансплантатов сухожилий сверхкритическим диоксидом углерода. *Вестник медицинского института "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье*. 2023;13(4):145-153. Budaev A.A., Borovkova N.V., Fain A.M., Nikolaev A.Yu., Makarov M.S., Storozheva M.V., Skuratovskaya K.I., Vaza A.Yu., Fomicheva I.V., Chernen'kaya T.V., Kanibolotskiy A.A. Evaluation of the effectiveness of allogeneic tendon graft sterilization with supercritical carbon dioxide. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ" (REHABILITATION, DOCTOR AND HEALTH)*. 2023;13(4):145-153. (In Russ). <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.4.TX.2>
- 11 De Girolamo L, Ragni E, Cucchiari M, van Bergen CJA, Hunziker EB, Chubinskaya S. Cells, soluble factors and matrix harmonically play the concert of allograft integration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(6):1717-1725. <https://doi.org/10.1007/s00167-018-5182-1>
- 12 Makarov M.S., Storozheva M.V., Borovkova N.V. Collagen fiber autofluorescence level in evaluating the biological properties of tissue grafts. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2017;9(2):83-90. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.4.TX.2/10.17691/stm2017.9.2.10>
- 13 Пушкина Т.А., Токаев Э.С., Попова Т.С., Мурашев А.Н., Тропская Н.С., Кислякова Е.А., Шашкова И.Г., Жеребцов А.В. Доклинические исследования эффективности специализированного продукта спортивного питания для коррекции физической работоспособности и психофизиологического состояния при интенсивных нагрузках. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2017;7(3):5-13. Pushkina T., Tokaev E., Popova T., Murashev A., Tropkaya N., Kislyakova E., Shashkova I., Zherebtsov A. Non-clinical studies of the effectiveness of specialized sports nutrition product for correction of physical efficiency and psycho-physiological condition during intensive loads. *Sports medicine: research and practice*. 2017;7(3):5-13. (In Russ). <https://doi.org/10.17238/ISSN2223-2524.2017.3.5>
- 14 Карпов А.А., Аникин Н.А., Черепанов Д.Е., Михайлова А.М., Краснова М.В., Смирнов С.С., Буненков Н.С., Чёфу С.Г., Ивкин Д.Ю., Моисеева О.М., Галагудза М.М. Модель хронической тромбоэмболической легочной гипертензии у крыс, вызванная повторным внутривенным введением биодegradируемых микросфер из альгината натрия. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2019;18(1):86-95. Karpov A.A., Anikin N.A., Cherepanov D.E., Mihailova A.M., Krasnova M.V., Smirnov S.S., Bunenkov N.S., Chefu S.G., Ivkin D.Y., Moiseeva O.M., Galagudza M.M. Model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in rats, caused by repeated intravenous administration of biodegradable microspheres from sodium alginate. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2019;18(1):86-95. (In Russ). <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2019-18-1-86-95>

Авторская справка

Будаев Антон Аркадьевич

Научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. ORCID 0000-0002-5864-5683; BudaevAA@sklif.mos.ru
Вклад автора: дизайн исследования, проведение эксперимента, анализ литературы, анализ данных, написание текста статьи.

Тропская Наталья Сергеевна

Д-р биол. наук, заведующая научной лабораторией экспериментальной патологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского; профессор кафедры 903 «Перспективные материалы и технологии аэрокосмического назначения», Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет). ORCID 0000-0001-5870-9483; ntropkaya@mail.ru
Вклад автора: дизайн исследования, проведение эксперимента, редактирование текста.

Боровкова Наталья Валерьевна

Д-р мед. наук, заведующая отделением биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского; доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов, Российской национальной исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова. ORCID 0000-0002-8897-7523; BorovkovaNV@sklif.mos.ru
Вклад автора: дизайн исследования, редактирование текста.

Файн Алексей Максимович

Д-р мед. наук, заведующий отделением неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского; профессор кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова. ORCID 0000-0001-8616-920X; FainAM@sklif.mos.ru
Вклад автора: дизайн исследования, редактирование текста.

Author's reference

Anton A. Budaev

Researcher at the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine. ORCID 0000-0002-5864-5683; BudaevAA@sklif.mos.ru
Author's contribution: research design, conducting an experiment, literature analysis, data analysis, writing the text of the article.

Nataliya S. Tropkaya

Dr. Sci. (Med.), Head of the Scientific Laboratory of Experimental Pathology, N.V. Sklifosovsky Scientific Research Institute of Emergency Medicine; Professor of the Department 903 "Advanced Materials and Technologies for Aerospace Purposes", Moscow Aviation Institute (National Research University). ORCID 0000-0001-5870-9483; ntropkaya@mail.ru
Author's contribution: research design, experiment, text editing.

Natal'ya V. Borovkova

Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine; Associate Professor of the Department of Transplantation and Artificial Organs, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University. ORCID 0000-0002-8897-7523; BorovkovaNV@sklif.mos.ru
Author's contribution: research design, text editing.

Aleksey M. Fain

Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Emergency Traumatology of the Musculoskeletal System, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine; Professor of the Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. ORCID 0000-0001-8616-920X; FainAM@sklif.mos.ru
Author's contribution: research design, text editing.

Титова Галина Павловна

Д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела патологической анатомии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0001-7843-5782; TitovaGP@sklif.mos.ru

Вклад автора: анализ данных, написание текста статьи.

Макаров Максим Сергеевич

Канд. биол. наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0002-2184-2982; mcsimmc@yandex.ru

Вклад автора: анализ литературы, анализ данных, написание текста статьи.

Ваза Александр Юльевич

Канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0003-4581-449X; VazaAU@sklif.mos.ru

Вклад автора: проведение эксперимента, редактирование текста.

Пonomarev Иван Николаевич

Канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0002-2523-6939; PonomarevIN@sklif.mos.ru

Вклад автора: проведение эксперимента.

Кислякова Екатерина Александровна

Канд. биол. наук, научный сотрудник научной лаборатории экспериментальной патологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0002-9485-0940; e-mail: kislakovakatia@mail.ru

Вклад автора: проведение эксперимента.

Кислицына Оксана Сергеевна

Научный сотрудник научной лаборатории экспериментальной патологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0001-6456-5420; e-mail: calesco@mail.ru

Вклад автора: проведение эксперимента.

Офицеров Андрей Аркадьевич

Научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0003-2170-0009; OficerovAA@sklif.mos.ru

Вклад автора: проведение эксперимента.

Кисель Дмитрий Александрович

Научный сотрудник отделения неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0002-5187-0669; dkis@yandex.ru

Вклад автора: проведение эксперимента.

Сторожева Майя Викторовна

Научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-00031927-2404; StorozhevaMV@sklif.mos.ru

Вклад автора: проведение эксперимента.

Сластин Владимир Викторович

Врач травматолог-ортопед, Городская клиническая больница им. С.С. Юдина.

ORCID 0000-0002-1256-2911; slastinin@gmail.com

Вклад автора: проведение эксперимента.

Каниболоцкий Александр Алексеевич

Канд. мед. наук, доцент, врач-патологоанатом, заведующий патолого-анатомическим отделением, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0001-6123-8387; dr.kaa@mail.ru

Вклад автора: интерпретация данных, подготовка иллюстративного материала.

Galina P. Titova

Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher of the Department of Pathological Anatomy, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0001-7843-5782; TitovaGP@sklif.mos.ru

Author's contribution: data analysis, writing the text of the article.

Maksim S. Makarov

Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0002-2184-2982; mcsimmc@yandex.ru

Author's contribution: literature analysis, data analysis, writing the text of the article.

Aleksandr Yu. Vaza

Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher at the Department of Emergency Traumatology of the Musculoskeletal System, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0003-4581-449X; VazaAU@sklif.mos.ru

Author's contribution: conducting an experiment, editing the text.

Ivan N. Ponomarev

Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher at the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0002-2523-6939; PonomarevIN@sklif.mos.ru

Author's contribution: conducting an experiment.

Ekaterina A. Kislyakova

Cand. Sci. (Biol.), Researcher at the Scientific Laboratory of Experimental Pathology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0002-9485-0940; e-mail: kislakovakatia@mail.ru

Author's contribution: conducting an experiment.

Oksana S. Kislitsyna

Researcher at the Scientific Laboratory of Experimental Pathology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0001-6456-5420; e-mail: calesco@mail.ru

Author's contribution: conducting an experiment.

Andrey A. Offitserov

Researcher at the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0003-2170-0009; OficerovAA@sklif.mos.ru

Author's contribution: conducting an experiment.

Dmitriy A. Kisel'

Researcher at the Department of Emergency Traumatology of the Musculoskeletal System, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0002-5187-0669; dkis@yandex.ru

Author's contribution: conducting an experiment.

Maya V. Storozheva

Researcher at the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-00031927-2404; StorozhevaMV@sklif.mos.ru

Author's contribution: conducting an experiment.

Vladimir V. Slastin

Orthopedic traumatologist, S.S. Yudin City Clinical Hospital.

ORCID 0000-0002-1256-2911; slastinin@gmail.com

Author's contribution: conducting an experiment.

Aleksandr A. Kanibolotskiy

Cand. Sci. (Med.), Docent, pathologist, Head of the Pathology Department, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0001-6123-8387; dr.kaa@mail.ru

Author's contribution: interpretation of data, preparation of illustrative material.